

n° d'ordre: 3681

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE
(SCIENCES)

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité: Entomologie Appliquée

par

Philippe Menozzi

Intitulée:

CARACTERISATION D'INSECTES ET COMPREHENSION DES MECANISMES
DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES
A L'AIDE DE TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

soutenue le 10 Mars 2000 devant la commission d'examen composée de:

J.B. Bergé	INRA Antibes	Rapporteur
R. Delorme	INRA Versailles	Rapporteur
M. Raymond	Université Montpellier II	Rapporteur
D. Fournier	Université Paul Sabatier Toulouse	Directeur de thèse
D. Bourguet	INRA La Minière	Examineur
M. Vaissayre	CIRAD Montpellier	Examineur
F. Vanlerberghe-Masutti	INRA Antibes	Examineur

Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique.
Groupe de Biochimie des Protéines.
ESA CNRS 5068 - Université Paul Sabatier - Toulouse

n° d'ordre: 3681

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE
(SCIENCES)

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité: Entomologie Appliquée

par

Philippe Menozzi

Intitulée:

CARACTERISATION D'INSECTES ET COMPREHENSION DES MECANISMES
DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES
A L'AIDE DE TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

soutenue le 10 Mars 2000 devant la commission d'examen composée de:

J.B. Bergé	INRA Antibes	Rapporteur
R. Delorme	INRA Versailles	Rapporteur
M. Raymond	Université Montpellier II	Rapporteur
D. Fournier	Université Paul Sabatier Toulouse	Directeur de thèse
D. Bourguet	INRA La Minière	Examineur
M. Vaissayre	CIRAD Montpellier	Examineur
F. Vanlerberghe-Masutti	INRA Antibes	Examineur

Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique.
Groupe de Biochimie des Protéines.
ESA CNRS 5068 - Université Paul Sabatier - Toulouse

AGG GAG ATG GAG CGT TGT ATT GAG ATG GAG AAC ACC TCG

(*)

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur D. Fournier qui m'a chaleureusement accueilli et qui a tant appris à un entomologiste de terrain.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, avec une mention spéciale concernant D. Bourguet qui m'a prodigué à plusieurs reprises de précieux conseils et dont c'était la première participation à un jury de thèse.

Merci à toute l'équipe du Groupe Biochimie des Protéines du LSPCMIB, et plus particulièrement L. Chavant, A. Klæbe, L. Paquereau, Y. Boublik, A. Lougarre, M. Bardet pour leurs conseils scientifiques ainsi que pour les bons moments passés en leur compagnie. Merci aussi à C. Minet, en stage au laboratoire, qui m'a donné un sérieux coup de main pour faire avancer certaines manips.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien de mes supérieurs hiérarchiques du CIRAD-CA. J'aimerais remercier particulièrement M. Vaissayre, H. Saint Macary, C. Gaborel et J.P. Deguine qui m'ont sans cesse encouragé, qui ont mis à ma disposition les moyens financiers dont ils pouvaient disposer et qui m'ont témoigné leur confiance. Je remercie également le Directeur Scientifique du CIRAD, M. Dron, pour l'achat de l'équipement nécessaire à la réalisation de certaines expériences et pour avoir soutenu l'A.T.P., ce qui a permis la réalisation des travaux de thèse dans des conditions optimales.

Merci infiniment à L. De Cloedt et E. Saadoun pour leur efficacité à obtenir les documents dont j'avais besoin ainsi qu'à J. Sallin et H. Guillemain qui ont assuré remarquablement le soutien logistique et administratif.

Je tiens également à remercier A. Joly, J. Parriaud et M. Giner pour, d'une part la mise à ma disposition du matériel informatique, et d'autre part leurs conseils en matière d'informatique.

Merci à toutes les personnes qui m'ont fourni les échantillons d'insectes ou les amorces: mes collègues entomologistes S. Nibouche, P. Silvie, P. Ryckewaert, T. Martin, P. Prudent; M. Raymond de l'Université Montpellier 2; M. Arpagaus de l'INRA de Montpellier; R. Delorme de l'INRA de Versailles; C. Ferran de l'INRA d'Antibes; L. Deharveng et A. Bedos de l'U.P.S. de Toulouse.

Merci à mon collègue J.M. Vassal, pour ces longues conversations scientifiques (et autres) à chacun de mes séjours à Montpellier, et toujours dans une ambiance si agréable.

Je suis très reconnaissant envers J. Cauquil qui m'a toujours encouragé à me lancer dans ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier P. Piessen, pour son éternelle bonne humeur à chacune de ses visites ainsi que pour le champagne qu'il a offert à l'issue de la soutenance.

Je n'oublierai jamais A. Rousset que j'admirais pour sa gentillesse et sa méticulosité.

(*): REMERCIEMENTS

RESUME

Les outils moléculaires ont progressivement envahi de nombreux domaines de l'entomologie. Ces outils constituent un complément aux techniques classiques de caractérisation. Ils permettent aussi d'explorer des questions restées auparavant sans réponse dans certains domaines dont la résistance aux insecticides.

Les travaux de caractérisation moléculaire ont concerné plusieurs insectes avec des objectifs différents. Plusieurs biotypes de l'aleurode *Bemisia tabaci* ont été mis en évidence par RAPD-PCR. Cette technique a par ailleurs montré qu'une souche mutante de la coccinelle *Harmonia axyridis* ne présentait pas un polymorphisme différent de celui de la souche sauvage. Chez deux sous-espèces du collembole *Monobella grassei*, il a été observé un polymorphisme important qui n'a pas permis de préciser la position taxonomique des individus d'une zone de contact entre les sous-espèces. Par RAPD-PCR et CAPS d'un gène mitochondrial amplifié par PCR, l'hypothèse d'un croisement entre deux espèces de coccinelles, *Coccinella septempunctata* et *H. axyridis*, a été infirmée.

Les travaux sur la résistance aux insecticides ont concerné un des mécanismes majeurs de résistance chez les insectes: la modification de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux et cible de certains insecticides. Chez le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* et le moustique *Culex pipiens*, les stratégies de clonage du gène codant pour cette enzyme ont mis en évidence un gène codant pour une AChE non impliquée dans la résistance. Ce résultat remet en question l'existence d'un gène unique codant pour cette enzyme chez ces insectes. L'hypothèse de l'implication dans la résistance d'une enzyme à fonction cholinergique mais n'appartenant pas à la famille des cholinestérases a été émise.

Il a été montré par ailleurs que la surproduction d'acétylcholinestérase participait à la résistance de la drosophile aux insecticides. Les niveaux de résistance atteints par l'augmentation de la quantité d'enzyme demeurent faibles.

De nombreuses mutations, créées par mutagénèse dirigée, ont engendré une résistance aux insecticides de l'AChE de drosophile produite *in vitro*. La technique du PASA a montré que très peu d'entre elles sont retrouvées dans les populations naturelles. Dans des populations de drosophile n'ayant pas été soumises à une pression insecticide pendant plus de deux ans, l'analyse des allèles présents dans les individus ainsi que les cinétiques sur les enzymes mutées ont suggéré que le maintien de la résistance pouvait s'expliquer par un effet d'hétérosis et par recombinaison de certaines mutations.

SUMMARY

Molecular tools have enhanced many fields of entomology. These tools complement classical techniques of characterisation. They also allow to study questions remained without answer in some fields such as resistance to insecticides.

Molecular characterization work have been carried out on several insects with different aims. Several biotypes of the whitefly *Bemisia tabaci* were found by the RAPD-PCR technique. This technique also showed that a mutant strain of the ladybird *Harmonia axyridis* had the same polymorphism level as the wild type. The polymorphism level of two subspecies of the Collembola species *Monobella grassei* was too high for definition of the taxonomic position of samples collected in a contact zone between the subspecies. RAPD-PCR and CAPS techniques performed on mitochondrial gene resulted in rejection of the hypothesis of crossbreeding between two ladybirds species, *Coccinella septempunctata* and *H. axyridis*.

Work on resistance to insecticides was focused on one of the main resistance mechanisms, modification of acetylcholinesterase (AChE). This enzyme is involved in the transmission of nerve impulses and is targeted by some insecticides. Strategies for cloning the gene encoding this enzyme in the cotton aphid *Aphis gossypii* and the mosquito *Culex pipiens* resulted in a putative AChE gene not involved in insecticide resistance. This result leads to a degree of suspicion concerning the existence of a single gene encoding AChE for insects. The hypothesis of the involvement in insecticide resistance of an enzyme with cholinergic function but not belonging to cholinesterase family is put forward.

It is also shown that AChE overproduction is an additional insecticide resistance mechanism in drosophila. The resistance levels conferred by such an increase in AChE quantity remain small.

Many mutations performed by site-specific mutagenesis were found to confer insecticide resistance to recombinated drosophila AChE.. The PASA technique was used to show that only few mutations exist in natural populations. The different alleles found in the flies and kinetic analysis of mutated enzymes suggested that the maintenance of resistance in natural populations of drosophila without any selection pressure for more than two years could be explained by heterosis and recombination of certain mutations.

AVANT-PROPOS

Le sujet de la thèse a connu certaines modifications depuis l'inscription en thèse en 1994. Initialement, il concernait la mise au point des techniques de lutte contre l'aleurode *Bemisia tabaci*, ravageur important de nombreuses plantes cultivées dans les pays tropicaux, dont le Nicaragua où j'étais affecté. Ce sujet de recherche entrainait dans le cadre de mes activités au sein du programme coton du Département Cultures Annuelles du CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement).

De retour en France l'année suivante, la thèse s'est orientée vers l'étude des biotypes de *Bemisia tabaci* par des techniques de biologie moléculaire. Les échantillons ramenés du Nicaragua ainsi que ceux envoyés par mes collègues entomologistes en poste outre-mer ont permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité importante dans les biotypes de ce ravageur. Ces travaux ont été présentés au symposium international de Gand de 1997. Ces travaux n'ont pas été poursuivis car, pour que ces études sur les biotypes puissent constituer le sujet de la thèse, il était indispensable de disposer d'un nombre élevé d'échantillons du monde entier, avec le risque de ne pas en recevoir suffisamment.

L'expérience acquise dans le typage moléculaire de *Bemisia tabaci* a été mise à profit pour caractériser deux espèces de coccinelles (*Harmonia axyridis* et *Coccinella septempunctata*) ainsi que le collembole *Monobella grassei*.

Ces travaux de caractérisation sont développés dans la première partie de la thèse.

La résistance des insectes aux insecticides devenant un problème préoccupant dans certains pays où intervient le CIRAD, la thèse s'est naturellement orientée vers l'étude des mécanismes de résistance et plus particulièrement la résistance par modifications de la cible des insecticides organo-phosphorés et carbamates, l'acétylcholinestérase. L'objectif était de caractériser les mutations impliquées dans la résistance par ce mécanisme chez plusieurs insectes, tout en sachant qu'il existait un risque de n'avoir pas de résultats tangibles, des travaux ayant déjà été menés par d'autres équipes mais apparemment sans succès.

Ces travaux sur la résistance ont bénéficié en 1998 d'un financement du CIRAD dans le cadre de l'Action Thématique Programmée (ATP): détection moléculaire de la résistance aux insecticides organo-phosphorés et carbamates chez *Bemisia tabaci* (Genn.), Hemiptera, Aleyrodidae et *Aphis gossypii* (Glov.), Hemiptera, Aphididae, associant l'Université Paul Sabatier de Toulouse, l'INRA de Versailles et le CIRAD.

Malgré toutes les stratégies développées dans le cadre de cette thèse, les mutations impliquées dans la résistance n'ont pu être caractérisées chez les insectes étudiés. Les travaux pour tenter d'identifier ces mutations constituent l'essentiel de la thèse et sont détaillés dans la deuxième partie de la thèse.

En dernière année de thèse, j'ai participé à d'autres thématiques de recherche sur la résistance développées par le laboratoire d'accueil. Je me suis plus particulièrement intéressé à étudier la stabilisation de la résistance par modification de l'acétylcholinestérase dans des souches de drosophile maintenues en laboratoire sans pression de sélection. Tous ces travaux ont été intégrés dans la deuxième partie de la thèse.

ABREVIATIONS EMPLOYEES

AChE: acétylcholinestérase

ADNc: ADN complémentaire

BuChE: butyrylcholinestérase

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

dNTP: mélange des désoxynucléotides triphosphates: dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Kb: kilo bases

nt: nucléotides

O.P.: organo-phosphoré

PASA: PCR amplification of specific alleles

pb: paires de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Communication présentée au Symposium international de Gand (Belgique) en 1997:

Caractérisation de souches de *Bemisia tabaci* (Gennadius) par des techniques de biologie moléculaire. Menozzi P., 1997, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 62/2a, 281-288.

Publication 1, soumise à *Genetics*:

Acetylcholinesterase overproduction as contribution to insect resistance to insecticide in natural populations. Charpentier A., Menozzi P., Marcel V., Villatte F., Fournier D..

Publication 2, acceptée dans *Pesticide Biochemistry and Physiology*:

A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. Villatte F., Ziliani P., Marcel V., Menozzi P., Fournier D..

Publication 3, en préparation:

Heterosis and recombination as mechanism reducing the cost of mutations responsible for insecticide resistance. Menozzi P., Minet C., Boublik Y., Lougarre A., Villatte F., Saint Aguet P., Fournier D..

TABLE DES MATIERES

	page
PREMIERE PARTIE : TYPAGE MOLECULAIRE D'INSECTES	1
INTRODUCTION.....	2
1. CARACTERISATION DE BIOTYPES DE <i>BEMISIA TABACI</i> (Gennadius) (HEMIPTERA, ALEYRODIDAE) (Communication au symposium international de Gand, 1997)	5
2. ANALYSE DU POLYMORPHISME ET DU GENOTYPE DE DIFFERENTES SOUCHES DE <i>COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA</i> ET D' <i>HARMONIA AXYRIDIS</i> (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE).....	19
2.1. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE DEUX SOUCHES DE LA COCCINELLE <i>HARMONIA AXYRIDIS</i>	19
2.2. CARACTERISATION DU GENOTYPE DE LA DESCENDANCE DU CROISEMENT <i>HARMONIA AXYRIDIS</i> X <i>COCCINELLA</i> <i>SEPTEMPUNCTATA</i>	22
3. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES INDIVIDUS D'UNE ZONE DE CONTACT ENTRE DEUX SOUS-ESPECES DE L'ESPECE <i>MONOBELLA GRASSEI</i> (COLLEMBOLA, NEANURIDAE).	29
3.1. CARACTERISATION MOLECULAIRE PAR RAPD-PCR.....	31
3.2. ETUDE DE LA VARIABILITE DU GENE CODANT POUR LA SOUS-UNITE II DE LA CYTOCHROME OXYDASE MITOCHONDRIALE	37
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE	41
DEUXIEME PARTIE : RESISTANCE AUX INSECTICIDES PAR MODIFICATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE	43
INTRODUCTION.....	44
A. <u>GENERALITES</u>	45
1. LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES : SITUATION ET MECANISMES IMPLIQUES.....	45

2. L'ACETYLCHOLINESTERASE.....	50
2.1. STRUCTURE ET FONCTION.....	50
2.2. CARACTERISATION DU GENE CODANT POUR L'ENZYME.....	58
2.3. MODE D'ACTION DES INSECTICIDES.....	66
2.4. RESISTANCE AUX INSECTICIDES : MECANISMES MIS EN JEU ET INVENTAIRE DES MUTATIONS.....	68

<u>B. ESSAIS DE CLONAGE DU GENE CODANT POUR L'ACETYLCHOLINESTERASE SYNAPTIQUE CHEZ LE PUCERON APHIS GOSSYPHII Glover (HEMIPTERA, APHIDIDAE) ET LE MOUSTIQUE CULEX PIPIENS L (DIPTERA, CULICIDAE)</u>	71
--	----

1. ETAT DES CONNAISSANCES CHEZ <i>APHIS GOSSYPHII</i> ET <i>CULEX PIPIENS</i>	71
2. OBJECTIFS	75
3. LES STRATEGIES ADOPTEES	76
4. TRAVAUX REALISES.....	76
4.1. MATERIEL ET METHODES	76
4.2. RESULTATS	85
4.2.1. Clonage à partir de l'ADN complémentaire	85
4.2.1.1. Clonage à partir d'amorces de vertébrés et d'invertébrés définies dans les "boîtes conservées"	85
4.2.1.2. Clonage à partir d'amorces "anti-pasa "	103
4.2.2. Clonage à partir de l'ADN génomique	105
4.2.2.1. Clonage à partir d'amorces spécifiques du gène <i>Ace2</i> de <i>C. pipiens</i> et d' <i>A. gossypii</i> et d'amorces d'insectes définies dans les "boîtes conservées"	107
4.2.2.2. Clonage à partir d'amorces "anti-pasa "	116
4.2.2.3. Clonage à partir d'amorces de vertébrés et d'invertébrés définies dans les "boîtes conservées"	117
4.2.2.4. Clonage à partir d'amorces spécifiques de la drosophile.....	124
4.2.2.5. Etude de la variabilité de l'intron 3	127

5. DISCUSSION: NOMBRE DE GENES CODANT POUR L'ACETYLCHOLINESTERASE ET NATURE DE L'ENZYME SYNAPTIQUE.....	131
--	-----

<u>C. ETUDE DE LA RELATION ENTRE LA QUANTITE D'ACETYLCHOLINESTERASE ET LA RESISTANCE DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> Meig. (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) AUX INSECTICIDES (Publication 1).....</u>	139
---	-----

<u>D. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DE MUTATIONS DANS LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> MODIFIEE <i>IN VITRO</i> (Publication 2).....</u>	161
--	-----

<u>E. ETUDE DE LA STABILISATION DE LA RESISTANCE PAR MODIFICATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE CHEZ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>. (Publication 3).....</u>	183
---	-----

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.....	203
---------------------------------------	-----

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	205
---	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	210
-----------------------------------	-----

ANNEXES	225
---------------	-----

- 1: liste des amorces
- 2: alignements sequences *Ace2 Aphis gossypii* (exons) avec positions des amorces
- 3: alignements sequences *Ace2 Culex pipiens* (exons) avec positions des amorces
- 4: alignements séquences intron 3 *Ace2 Culex pipiens*
- 5: pourcentage d'homologie entre acétylcholinestérases d'invertébrés

PREMIERE PARTIE : TYPAGE MOLECULAIRE D'INSECTES

PREMIERE PARTIE : TYPAGE MOLECULAIRE D'INSECTES

INTRODUCTION

Les systématiciens recourent de plus en plus aux différentes techniques de biologie moléculaire pour la classification et la filiation des espèces. Ces techniques constituent un outil supplémentaire aux techniques plus classiques qui font appel aux variations morphologiques, chimiques et protéiques. Loxdale et Lushai (1998) ont passé en revue les différentes techniques utilisées en entomologie impliquant les marqueurs moléculaires.

La technique RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) vise à explorer le génome des insectes sans nécessité d'informations préalables sur le génome des organismes étudiés (Hadrys *et al.*, 1992). Elle consiste à amplifier au hasard des portions de génome à l'aide de marqueurs moléculaires qui sont des oligonucléotides de petite taille (de l'ordre de 10 bases). Après électrophorèse, le profil d'amplification obtenu, unique pour chaque individu, permet non seulement sa caractérisation mais est aussi un bon indicateur du polymorphisme de la population dont il est issu.

Cette technique, qui nécessite des quantités d'ADN minimales (de l'ordre de quelques nanogrammes), a été utilisée pour distinguer une souche asiatique de *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) d'introduction récente aux Etats Unis de la souche autochtone (Garner et Slavicek, 1996), pour évaluer l'efficacité de lâchers de renforcement de plusieurs espèces de punaises prédatrices appartenant au genre *Orius* (Gozlan *et al.*, 1997) ou pour caractériser plusieurs espèces proches du moustique *Anopheles albitalis* (Wilkerson *et al.*, 1995). Vanlerberghe-Masutti (1994) a utilisé cette technique pour caractériser différentes lignées de *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) dans le but d'optimiser l'élevage en laboratoire des souches qui seront ensuite libérées au champ. L'efficacité de la souche de laboratoire sélectionnée par rapport à celle de la souche naturelle peut être vérifiée après le lâcher inondatif en comparant selon la technique RAPD-PCR les empreintes génétiques des deux souches.

Lorsque la séquence nucléotidique est connue, d'autres techniques peuvent être employées. Elles sont basées sur la comparaison de séquences nucléotidiques de portions définies de génome comme par exemple dans le cas de la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): des régions de l'ADN sont clivées par des enzymes de restriction déterminées, séparées par électrophorèse et révélées par des sondes radioactives. La variation du profil obtenu ainsi que la variabilité de la séquence constituent l'information qui permet de comparer entre eux les échantillons. Il existe d'autres techniques basées sur le comportement électrophorétique de l'ADN en conditions non dénaturantes: SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) ou en conditions dénaturantes: DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) (Tagu, 1999). Ces techniques permettent de distinguer des fragments d'ADN dont la séquence nucléotidique peut varier ponctuellement.

Les techniques de biologie moléculaire utilisées en systématique concernent aussi bien l'ADN nucléaire que l'ADN mitochondrial.

Au sein de l'ADN nucléaire, se trouvent les gènes uniques mais aussi les microsatellites et les minisatellites. Ces derniers sont des séquences répétées d'oligonucléotides (de trois à plusieurs centaines de bases) que l'on trouve dans les parties hypervariables intergéniques. Ces régions ont subi d'assez grandes variations au cours de l'évolution. Le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre et se transmet héréditairement (Etienne, 1996). Ces marqueurs génétiques ont été ainsi utilisés par Lu *et al.* (1994) pour différencier, par RFLP, deux souches morphologiquement identiques de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) mais vivant sur deux plantes différentes (riz et maïs). Les microsatellites ont été utilisés pour étudier la structure génétique de populations naturelles du moustique *Anopheles gambiae* en Afrique (Lanzaro *et al.*, 1995), du puceron *Aphis gossypii* (Vanlerberghe-Masutti, 1998) ou de la mouche *Glossina palpalis* vectrice du trypanosome (Solano *et al.*, 1997).

Une portion d'ADN nucléaire souvent utilisée par les taxonomistes est celle codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique. Elle possède à la fois des régions conservées quelle que soit l'espèce et des régions très variables. Elle est d'une part présente chez tous les organismes et possède d'autre part une taille suffisante (1600 pb) pour permettre des

comparaisons entre espèces (Watson *et al.*, 1994) ainsi que des analyses phylogénétiques. C'est ainsi que la classification des Homoptera et des Auchenorrhyncha a été actualisée en 1995 par Campbell *et al.* par comparaison entre les différents individus de la séquence nucléotidique de ce fragment d'ADN nucléaire.

L'ADN mitochondrial se prête bien aux analyses phylogénétiques. Cet ADN extranucléaire est hérité de la mère (la transmission de mitochondries d'origine paternelle a été observée, mais dans une faible proportion chez certains organismes: la drosophile, la souris et deux espèces de moule, *Mytilus edulis* et *M. trossulus* (Zouros *et al.*, 1992; Skibinski *et al.*, 1994)). L'ADN mitochondrial ne se recombine normalement pas, à la différence de l'ADN nucléaire. De plus, il est l'objet d'un taux de mutation 10 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. Les caractéristiques propres à l'ADN mitochondrial en font un matériel privilégié pour étudier l'évolution des espèces pour des périodes relativement brèves. C'est ainsi que Howland et Hewitt (1995) ont séquencé une partie (400 pb) du gène codant pour la cytochrome oxidase I mitochondriale pour construire un arbre phylogénétique des Coléoptères. Hiss *et al.* (1994) ont visualisé par SSCP des différences entre individus sur l'ADN mitochondrial chez plusieurs familles d'insectes.

Trois études de typage moléculaire ont été menées dans le cadre de cette thèse. Elles ont débuté par la caractérisation moléculaire de biotypes de *Bemisia tabaci*, un aleurode ravageur de nombreuses plantes cultivées principalement tropicales, sur des échantillons que j'avais récoltés au Nicaragua ainsi que sur des échantillons récoltés par mes collègues entomologistes du CIRAD. Ensuite, le laboratoire d'entomologie et de lutte biologique de l'Unité Santé Végétale et Environnement de l'INRA d'Antibes m'a confié l'étude du polymorphisme d'une souche sélectionnée de la coccinelle *Harmonia axyridis* ainsi que l'étude du génotype de la descendance du croisement de deux espèces de coccinelles: *Harmonia axyridis* et *Coccinella septempunctata*. Enfin, j'ai effectué pour le compte du laboratoire d'écologie terrestre de l'UPS (UMR 5552 UPS-CNRS) une étude visant à caractériser des collemboles de l'espèce *Monobella grassei*.

Deux autres études concernant *Bemisia tabaci* auraient dû être menées en collaboration avec des entomologistes du CIRAD. Il s'agissait d'essayer de mettre en évidence par RAPD-PCR des biotypes particuliers impliqués dans la transmission du virus responsable du TYLC (Tomato Yellow Leaf Curl) à La Réunion ainsi que des biotypes susceptibles d'être responsables de la "maladie des cotonniers rouges (MCR)" au Cameroun. Le projet de La Réunion a démarré trop tardivement. Au Cameroun, d'une part, il n'a pas été toujours possible d'obtenir des échantillons dans la zone initialement infestée (région de Touboro) et d'autre part la MCR s'est rapidement généralisée à l'ensemble de la zone cotonnière camerounaise.

1. CARACTERISATION DE BIOTYPES DE *BEMISIA TABACI* (HEMIPTERA, ALEYRODIDAE)

Communication présentée au Symposium international de Gand (Belgique) en 1997:
Caractérisation de souches de *Bemisia tabaci* (Gennadius) par des techniques de biologie moléculaire. Menozzi P., 1997, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 62/2a, 281-288.

L'aleurode *Bemisia tabaci* est considéré depuis le début des années 80 comme un ravageur important des cultures tropicales (Vayssaire *et al.*, 1998). Des pullulations ont été signalées en 1986 en Floride, aux Etats-Unis. Elles ont été attribuées à un biotype nouveau (biotype "B") qui aurait progressivement supplanté le biotype préexistant (biotype "A"). Ce nouveau biotype présente les caractéristiques suivantes:

- responsable de nouveaux symptômes de type désordre physiologique sur certaines plantes: argenture des feuilles de cucurbitacées
- transmission de nouveaux virus
- fertilité accrue
- nouvelles plante-hôtes: poinsettia, agrumes, crucifères.

Ce biotype s'est rapidement répandu à l'Ouest des Etats-Unis puis est apparu dans les Antilles (Ryckewaert, 1998). Ce biotype étant morphologiquement identique au biotype "A", des techniques de caractérisation moléculaires ont été utilisées pour connaître sa distribution

géographique. L'analyse d'échantillons du Nicaragua, du Cameroun du Bénin et de Côte d'Ivoire par la technique RAPD - PCR a fait l'objet d'une communication au symposium international de Gand (Belgique) en 1997 et dont le texte publié est joint à la fin de ce paragraphe. Il a été montré que le biotype "B", que certains entomologistes ont élevé au rang d'espèce nouvelle (*B. argentifolii*), n'aurait pas encore totalement envahi le monde. En effet, ce biotype n'a pas été observé dans les pays d'Afrique et d'Amérique centrale. Plusieurs autres biotypes ont été caractérisés en relation avec la plante-hôte et la situation géographique.

J'ai ensuite analysé par RAPD-PCR des échantillons de Martinique, du Paraguay, de Turquie, de Guinée, du Cameroun et du Sénégal selon un protocole similaire. Au total, 8 échantillons ont été analysés. L'essai comportait deux témoins: les biotypes A et B.

Liste des échantillons testés:

A: biotype A, Université de Tucson, Arizona (USA) Mars 1997 ;
 B: biotype B, Université de Tucson , Arizona (USA) Juin 1998 ;
 M1: Martinique, choux Juin 1998 ; M2: Martinique, choux Mai 1997 ;
 P: Paraguay, Caacupe, tomate, Juillet 1998 ;
 T1: Turquie, Adana, coton, Juin 1997 ; T2: Turquie, coton, Antalya, Juillet 1996 ;
 G: Guinée, Bordo, coton, Novembre 1996 ;
 C: Cameroun, Maroua, coton avec symptômes de MCR, Octobre 1996 ;
 S1: Sénégal, Tambacounda, coton, 05 Novembre 1998 ; S2: Sénégal, Tambacounda, coton, 09 Novembre 1998 ; S3: Sénégal, Donaye (Podor), coton, Novembre 1998 ;

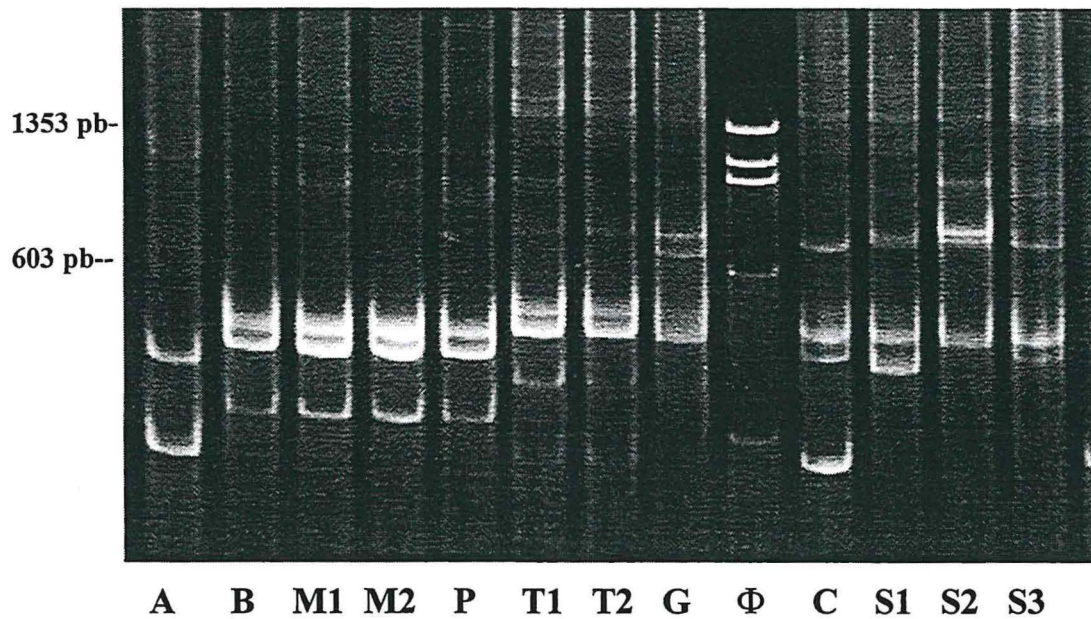
Seules, quatre amorces ont été testées:

code	nbre nucléotide	%G/C	Séquence
A01	10	70	CAGGCCCTTC
A09	10	70	GGGTAACGCC
A15	10	60	TTCCGAACCC
A19	10	60	CAAACGTCGG

L'analyse des profils d'amplification avec les amorces A10 et A04 (figure 1) montre clairement que les échantillons de Martinique et du Paraguay sont similaires au biotype "B" d'Arizona. Ceux des autres pays montrent une certaine similitude entre eux mais ne seraient

ni le biotype "B" ni le biotype "A". Ces résultats confirment que le biotype "B", au moment où les prélèvements d'échantillons ont été effectués, n'a pas supplanté les biotypes préexistants mais confirment l'existence de nombreux biotypes.

AMORCE A10:



AMORCE A04:

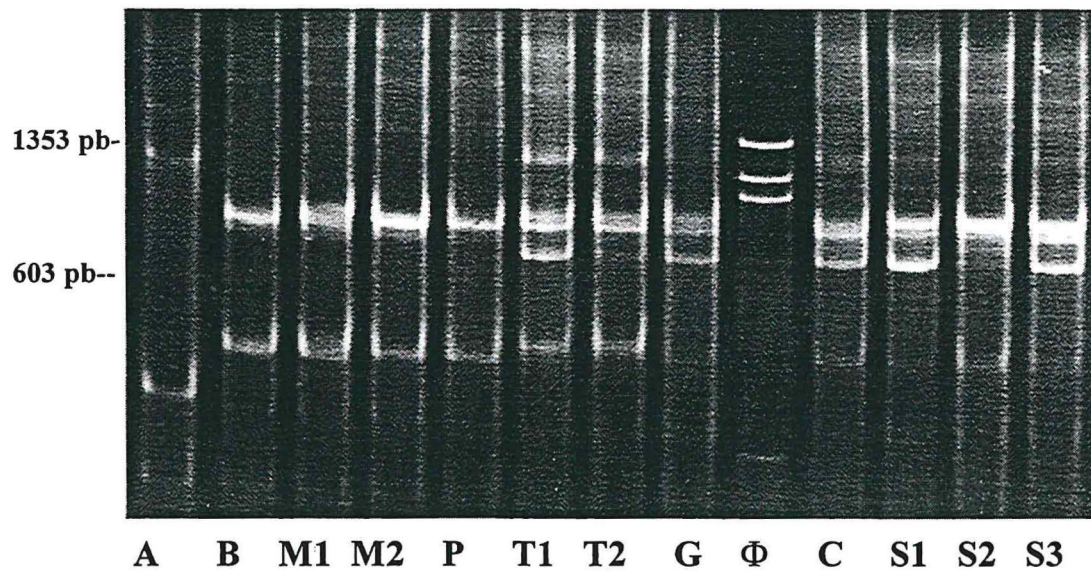


Figure 1: Profils d'amplification obtenus avec les amorces A10 et A04:

A: biotype A, Université de Tucson, Arizona (USA) Mars 1997 ; B: biotype B, Université de Tucson, Arizona (USA) Juin 1998 ; M1: Martinique, choux Juin 1998 ; M2: Martinique, choux Mai 1997 ; P: Paraguay, Caacupe, tomate, Juillet 1998 ; T1: Turquie, Adana, coton, Juin 1997 ; T2: Turquie, coton, Antalya, Juillet 1996 ; G: Guinée, Bordo, coton, Novembre 1996 ; C: Cameroun, Maroua, coton MCR, Octobre 1996 ; S1: Sénégal, Tambacounda, coton, 05 Novembre 1998 ; S2: Sénégal, Tambacounda, coton, 09 Novembre 1998 ; S3: Sénégal, Donaye (Podor), coton, Novembre 1998 ; F: marqueur de taille.

Communication présentée au Symposium international de Gand (Belgique) en 1997:

Caractérisation de souches de *Bemisia tabaci* (Gennadius) par des techniques de biologie moléculaire. Menozzi P., 1997, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 62/2a, 281-288.

CARACTERISATION DE SOUCHES DE *BEMISIA TABACI* (GENNADIUS) PAR DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Philippe MÉNOZZI

CIRAD-CA

BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France

RESUME

L'accroissement depuis 10 ans des problèmes liés à *Bemisia tabaci* a été en grande partie lié à l'apparition d'un biotype plus agressif qui aurait envahi progressivement le monde. Certaines caractéristiques biologiques de ce biotype ont incité certains entomologistes à élever ce biotype au rang d'espèce nouvelle appelée *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring.

L'amplification au hasard de certaines portions du génome par RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) a été employée pour identifier des échantillons d'adultes provenant de trois pays d'Afrique (Bénin, Cameroun et Côte d'Ivoire) et d'un pays d'Amérique Centrale (Nicaragua) récoltés sur différentes plante-hôtes. Ces techniques de biologie moléculaire, par rapport à l'analyse enzymatique, offrent l'avantage de pouvoir distinguer aisément des espèces ou des souches très proches. L'analyse des profils d'amplification selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages) a fait apparaître l'existence de plusieurs biotypes selon la nature de la plante-hôte et de la situation géographique.

INTRODUCTION

L'augmentation croissante depuis le milieu des années 80 des problèmes liés à *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae), a été attribuée en grande partie à l'apparition d'un biotype nouveau appelé biotype B qui aurait progressivement envahi le monde. Ce biotype est morphologiquement non différent du biotype initial (biotype A) mais a des caractéristiques biologiques propres: fertilité accrue, plante-hôtes nouvelles (dont le poinsettia, les agrumes et les crucifères) et est responsable d'un symptôme particulier (argenteure) sur les feuilles de nombreuses cucurbitacées. Bellows *et al.* (1994), en se basant principalement sur des études de croisement entre les biotypes, ont élevé le biotype B au rang d'espèce nouvelle: *Bemisia argentifolii* mais la classification n'est pas encore définitive. Cahill *et al.* (1996), de l'IACR de Rothamsted en Angleterre, préfèrent conserver le nom de *Bemisia tabaci* en la considérant comme une espèce polytypique.

Ces biotypes sont le plus souvent mis en évidence par des études moléculaires et biochimiques. Brown *et al.* en ont fait l'inventaire en 1995: il s'agit principalement d'études portant sur les isozymes telles que des estérases et la glycérphosphate déshydrogénase (Burban, 1991; Perring *et al.*, 1992; Wool *et al.*, 1994; Byrne *et al.*, 1995) et sur l'ADN par la technique RAPD-PCR d'amplification au hasard de certaines portions du génome (Gawel et Bartlett, 1993, Guirao *et al.*, 1994). La technique RAPD-PCR offre l'avantage de ne pas à avoir à travailler avec du matériel frais d'une part et d'autre part, de pouvoir faire apparaître plus de variations entre les biotypes puisqu'on travaille directement sur le génome. Cette méthode a été développée en 1990 par Williams *et al.* et par Welsh et Mc Clelland. Elle permet de distinguer des espèces ou de souches très proches difficilement différenciables morphologiquement (Black *et al.*, 1992; Cenis *et al.*, 1993; Vanlerberghe-Masutti, 1994; Wilkerson *et al.*, 1993; Garner et Slavicek, 1996). Elle permet aussi de trouver l'origine d'espèces récemment introduites ou de souches résistantes (Williams *et al.*, 1994; Al-Aboodi et ffrench-Constant, 1995; Antolin *et al.*, 1996). Mais l'inconvénient, comme l'indique Black (1993), c'est qu'il n'est pas toujours aisé d'obtenir des résultats reproductibles car cette technique est très sensible à la variation des nombreux facteurs du milieu tels que la composition des solutions tampon, la concentration en ADN et les paramètres liés à l'amplification elle-même. Il est donc très difficile d'obtenir exactement les mêmes profils d'amplification d'un laboratoire à un autre.

L'objectif de ce travail réalisé à l'Université Paul Sabatier de Toulouse au sein du laboratoire d'Entomologie Appliquée a été d'essayer de caractériser par la technique RAPD-PCR des échantillons de *Bemisia tabaci* en provenance de différents pays. Plus précisément, l'objectif du présent travail a été d'essayer de répondre aux deux questions suivantes:

- existe-t-il un polymorphisme moléculaire chez *Bemisia tabaci* permettant de différencier différentes souches ?
- les souches ont-elles des relations d'ordre géographique ou alimentaire ?

MATERIELS ET METHODES

Les échantillons de *Bemisia tabaci* étudiés ont été recus du Nicaragua, du Cameroun, du Bénin, de Côte d'Ivoire. Nous avons reçu la souche élevée à l'USDA de Montpellier (France) à partir d'une souche originaire de l'INRA d'Antibes ainsi qu'un témoin ayant été caractérisé par A. Devons-hire de l'IACR de Rothamsted (Angleterre) comme étant le biotype B.

Les échantillons ont été conservés dans de l'alcool à 70° et placés à -20°C dès leur réception.

Liste des échantillons reçus:

	date récolte	lieu récolte	plante-hôte
NICARAGUA	22.01.95	Posoltega	cotonnier
	24.01.95	Cebaco	pastèque
	24.01.95	Cebaco	concombre
	24.01.95	Cebaco	haricot
	24.01.95	Cebaco	courge
	01.02.95	Telica	cotonnier
	03.02.95	Chinandega	Poinsettia
	06.03.95	Boaco	concombre
	06.03.95	Boaco	<i>Thitonia sp.</i>
CAMEROUN	13.10.95	Maroua	cotonnier
	17.10.95	Maroua	tomate
	13.10.95	Maroua	manioc
	29.11.95	Touboro	cotonnier
	30.11.95	Tchollire	cotonnier
	08.11.95	Boki	cotonnier
	01.12.95	Djalingo	cotonnier
BENIN	13.11.95	Savalou	cotonnier
	30.11.95	Okpara	cotonnier
	18.11.95	CPE Angar	cotonnier
COTE D'IVOIRE	18.11.95	Bouake	cotonnier

Techniques employées:

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole établi par Gawel et Bartlett (1993) mais en broyant le ou les individus dans 50 µl de CHELEX (Walsh *et al.*, 1991) qui est une résine qui a la propriété d'augmenter le signal d'amplification en présence de faibles quantités d'ADN et d'empêcher l'action des DNAses en chélatant les ions métalliques nécessaires à leur activité. Le broyat est

mis à incuber 30 minutes à 55°C puis 10 minutes à 100°C pour dénaturer les protéines. L'ADN en solution est récupérée après centrifugation à 15000 t/min. pendant 10 minutes.

Initialement, l'ADN était extrait sur chaque individu, mais rapidement il a fallu, pour avoir une amplification correcte, broyer à la fois 15 à 20 individus. On s'est en effet aperçu qu'il y avait une dégradation de l'ADN des échantillons conservés dans l'alcool à 70° ce qui a empêché à partir d'un certain moment d'obtenir des amplifications. Post *et al.* (1993) et Stevens et Wall (1995) ont observé le même phénomène. Post *et al.* recommandent de conserver les échantillons dans l'azote liquide mais ont obtenu une bonne préservation de l'ADN en maintenant les échantillons dans de l'alcool à 100° à 4°C. Par spectrophotofluorométrie, en utilisant de la bisbenzimidazole, on a noté sur des échantillons fraîchement collectés une teneur en ADN de 2,5 ng/μl et par individu, ce qui convient pour une amplification, mais qui diminue entre 1,6 à 0,5 ng/μl après 6 mois de conservation dans l'alcool, ce qui est insuffisant. En travaillant sur plusieurs individus à la fois, le polymorphisme de la population ne peut être pris en compte mais on a considéré que cela permettait d'être dans des conditions de polymorphisme moyen qui reflètent assez fidèlement les caractéristiques d'une population de *Bemisia tabaci* généralement homogène (Guirao *et al.*, 1994; Gaweł et Bartlett, 1993) pour un lieu géographique donné. Mais il serait préférable, pour des échantillons ayant à voyager à température ambiante, de les conserver dans une solution tamponnée de thiocyanate de guanidium 4M comme le préconisent Laulier *et al.* (1995).

Les conditions expérimentales de l'amplification par RAPD-PCR étaient les suivantes:

- par tube: 1 à 5 μl d'ADN dans 25 ml d'une solution contenant un tampon (75 mM Tris HCl à pH 9 contenant 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% (W/V) Tween 20), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de nucléotides, 1,6 ng/μl d'amorce et 0,5 unité de Taq polymérase (Goldstar d'EUROGENTEC).
- le programme du thermocycler (Thermojet d'EUROGENTEC) était le suivant: 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 36°C et 60 secondes à 72°C, en 35 cycles.

13 amorces ont été utilisées:

code	nbre nucleotide	%G/C	Séquence
A01	10	70	CAGGCCCTTC
A02	10	70	TGCCGAGCTG
A03	10	70	AGTCAGCCAC
A04	10	60	AATCGGGCTG
A09	10	70	GGGTAACGCC
A11	10	60	CAATCGCCGT
A12	10	60	TCGGCGATAG
A13	10	70	CAGCACCCAC
A15	10	60	TTCCGAACCC
A17	10	60	GACCGCTTGT
A18	10	60	AGGTGACCGT
A19	10	60	CAAACGTCGG
A20	10	60	GTTGCGATCC

Les fragments obtenus ont été visualisés après migration sur un gel d'acrylamide à 8% du produit de l'amplification et révélation sous lumière UV des gels colorés au bromure d'éthidium. Chaque gel comportait le marqueur moléculaire ΦX174 digéré par Hae III.

Concernant les analyses de caractérisation, seules les amorces ayant donné une amplification permettant une discrimination aisée des fragments ont été retenues. De plus, n'ont pas pris en

compte les fragments de plus de 1.5 kb dont la présence ou l'absence peut parfois être considérée comme un artéfact plutôt qu'une caractéristique de l'individu ou de la souche.

Méthode d'analyse des résultats:

Pour caractériser les échantillons récoltés, nous avons utilisé l'analyse phénétique qui consiste en la construction d'arbres établis à partir de caractères de ressemblance qui sont ici la présence ou l'absence de fragments d'amplification obtenus dans les différents profils. On choisit ainsi dans chaque gel d'amplification plusieurs fragments et l'on note pour chaque échantillon leur présence (notée 1) ou leur absence (notée 0). On obtient ainsi, en cumulant les observations pour toutes les amorces qui ont donné des amplifications interprétables, une matrice qui sera analysée selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages) grâce au programme informatique RAPDLOT créé par Kambhampati *et al.* (1992). Ce programme compare de proche en proche le profil de 2 échantillons et prend en compte le ou les bandes qu'ils ont en commun (ou qu'ils n'ont pas tous les 2). Ainsi tous les échantillons de chaque gel sont comparés 2 à 2. On obtient un coefficient de similarité M qui est la somme des moyennes des bandes communes pour chaque appairement divisée par le nombre total d'appairements. Les programmes NEIGHBOR et DRAWGRAM du logiciel PHYLIP 3.5 C (Felsenstein, 1992) dessinent le phénogramme qui permet de visualiser les relations possibles entre les différents échantillons.

RESULTATS OBTENUS

Sur les 13 amorces testées, 4 ont donné des amplifications qui ont permis l'analyse des profils pour l'ensemble des échantillons reçus: il s'agit des amorces A01, A09, A15 et A19 (figure 1). Le nombre de fragments retenus pour l'analyse ont été respectivement 7, 8, 6 et 8 soit un total de 29. L'échantillon de Tchollire du Cameroun ainsi que celui de Telica du Nicaragua ont été éliminés car l'amplification avec 3 des 4 amorces a été insuffisante.

Le phénogramme obtenu (figure 2) fait apparaître un polymorphisme moléculaire différenciant les échantillons d'adultes d'Afrique (Cameroun, Bénin et Côte d'Ivoire), d'Europe (Angleterre, France) et du Nicaragua, selon la situation géographique et selon la plante-hôte.

Les échantillons du Nicaragua, quelle que soit la plante-hôte, constitueraient un groupe nettement différencié de l'autre groupe qui comprend à la fois les échantillons d'Europe et d'Afrique. A l'intérieur du groupe Nicaragua, l'échantillon récolté sur *Thitonia sp.* (adventice de la famille des Astéracées) se détacherait des autres échantillons. De même, l'échantillon récolté sur poinsettia constituerait un groupe à part.

L'échantillon récolté à Maroua (Cameroun) sur manioc se détache du groupe Afrique et Europe. On peut supposer que se soit développé sur cette plante un biotype particulier. Cela semble confirmer les résultats obtenus par Burban (1991).

Les deux échantillons d'Europe sont proches l'un de l'autre. A. Devonshire l'ayant référencé comme étant le biotype B, on peut raisonnablement en conclure que l'échantillon récolté en France fait partie du même biotype.

L'unique échantillon de Côte d'Ivoire semble s'éloigner du reste des échantillons d'Afrique.

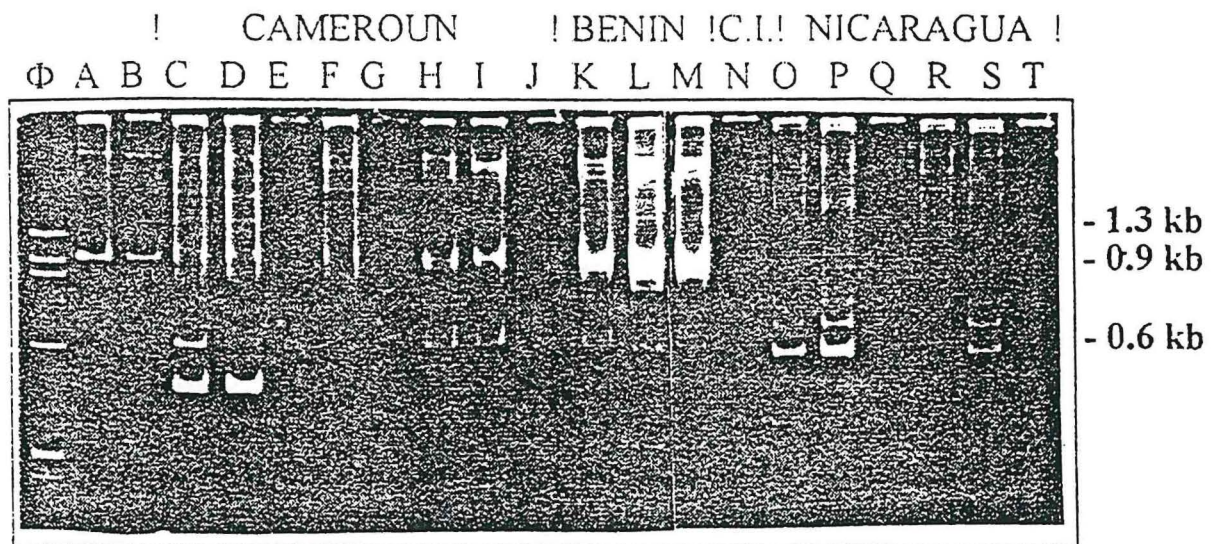
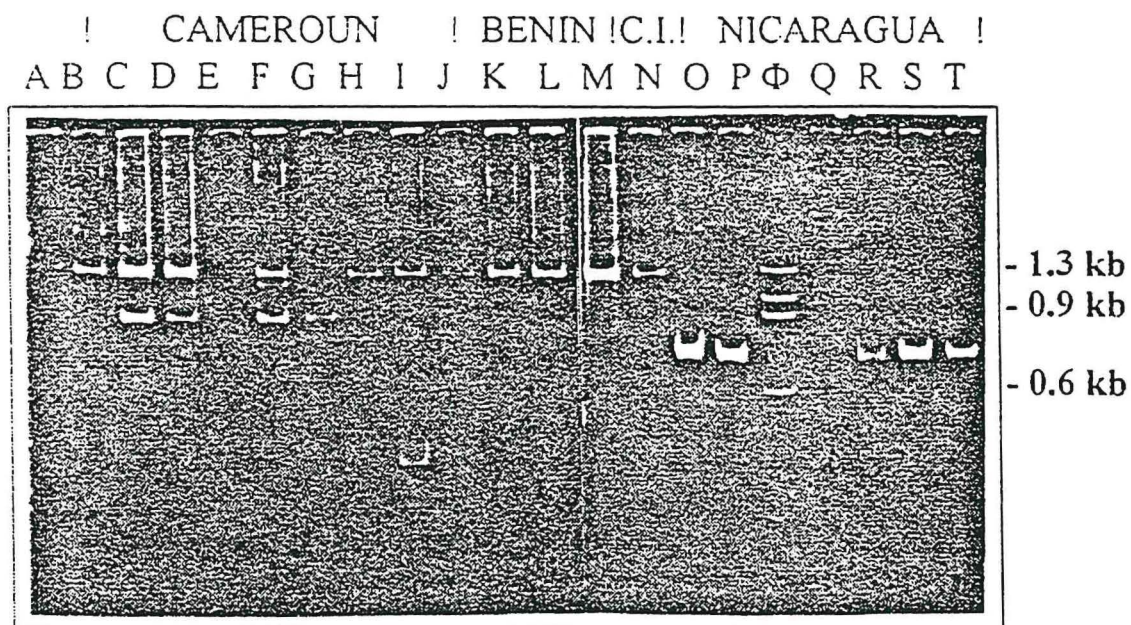
Amorce A01:**Amorce A19:**

Figure 1: Profils d'amplification obtenus pour *Bemisia tabaci* avec les amorces A01 et A19

ANGLETERRE (biotype B): A FRANCE: B
 CAMEROUN: C et D: Touboro, cotonnier; E: Tchollire, cotonnier; F: Djalingo
 cotonnier, G: Boki, cotonnier; H: Maroua, cotonnier; I: Maroua, tomate;
 J: Maroua, manioc
 BENIN: K: Okpara, cotonnier; L: CPE Angar, cotonnier; M: Savalou, cotonnier
 COTE D'IVOIRE: N: Bouake, cotonnier
 NICARAGUA: O: Cebaco, haricot; P: Cebaco, courge; Q: Telica, cotonnier; R: Chinandega,
 poinsettia; S: Boaco, concombre; T: Boaco, *Thitonia sp.*
 Φ: marqueur moléculaire ΦX174 digéré par Hae III

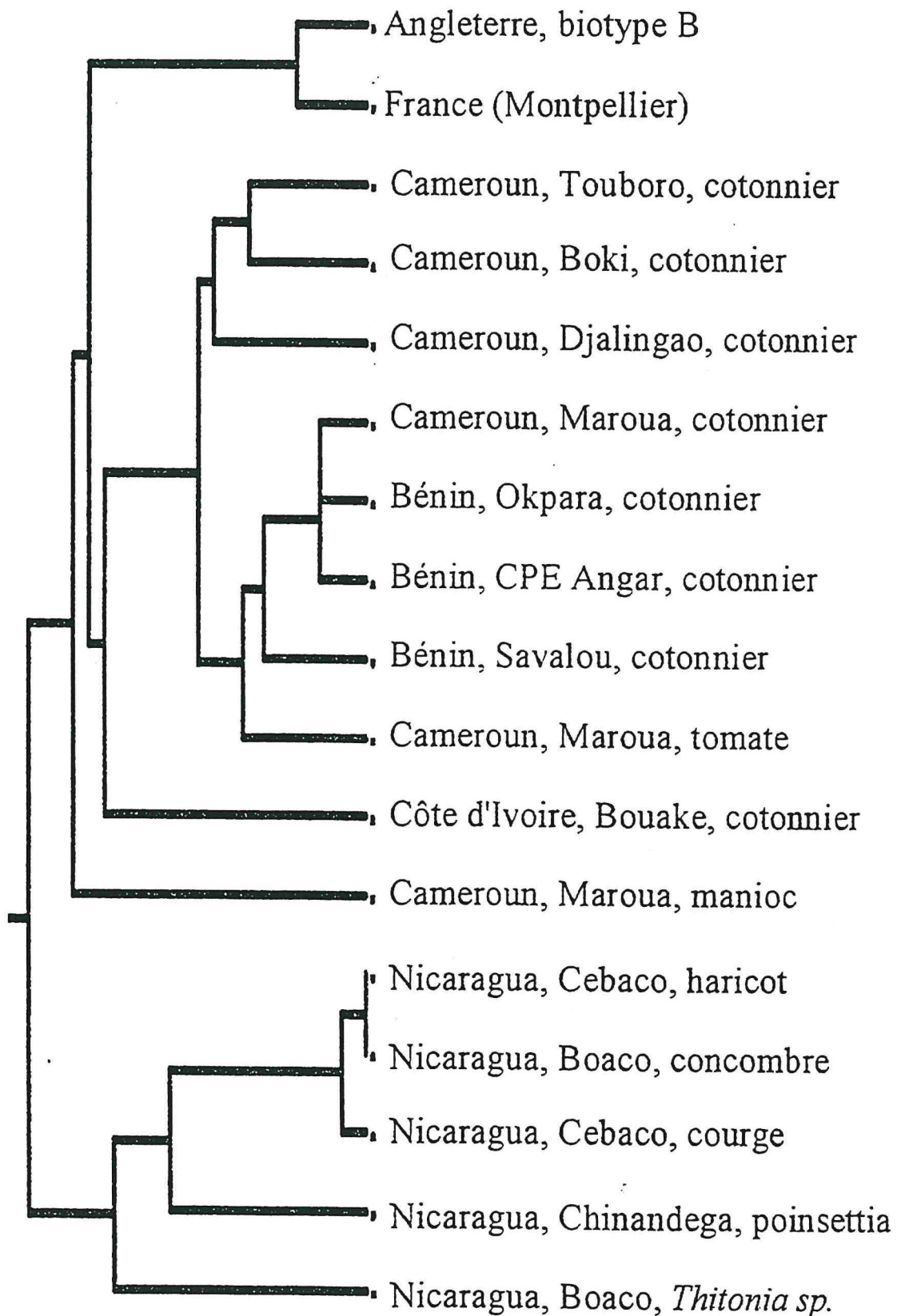


Figure 2: phénogramme des souches de *Bemisia tabaci*
(29 fragments analysés avec 4 amorces)

DISCUSSION

L'analyse du phénogramme obtenu sur des résultats d'amplification de portions de génome par RAPD-PCR semble indiquer que de nombreux biotypes existeraient en relation à la fois avec la plante-hôte et la situation géographique, ce qui semble infirmer l'hypothèse de l'envahissement par un seul nouveau biotype mais semble confirmer que l'apparition du biotype B n'était que le résultat temporaire d'un processus évolutif, d'une adaptation de *B. tabaci* à de nouvelles plantes hôtes par recombinaison. Ces résultats ont de plus montré que *B. tabaci* était un bon exemple de l'évolution d'un insecte phytophage par migration d'un nouveau biotype, croisement avec les populations pré-existantes et sélection de nouveaux biotypes.

Il faut bien insister que sur le fait que, quoiqu'encourageants, ces résultats sont préliminaires. En effet, trop peu d'échantillons ont été analysés et il est donc nécessaire de poursuivre cette étude en analysant des populations d'origine géographique très différente et récoltées sur des hôtes variés. En élargissant les analyses à l'ensemble du monde, il serait possible, d'une part, de mieux connaître la répartition géographique des différents biotypes et d'autre part de mieux comprendre de quelle façon s'est faite l'expansion de ce ravageur.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF STRAINS OF *BEMISIA TABACI* (GENNADIUS) USING MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

The increase over the past ten years in problems related to *Bemisia tabaci* results to a considerable extend from a more aggressive biotype that appears to have spread steadily throughout the world. Some biological characteristics of the biotype have led some entomologists to raise this biotype to the rank of a new species called *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. Random amplification of some parts of the genome using RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) was used to identify samples of adults from three countries in Africa (Benin, Cameroon and Ivory Coast) and one in Central America (Nicaragua) collected on different host plants. In comparison with enzymatic analysis, these molecular biology techniques have the advantage of enabling easy distinction between very close species of strains. Analysis of the amplification patterns using the UPGMA method (Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages) revealed the existence of several biotypes according to the nature of the host plant and the geographical location.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Aboodi, A., Ffrench-Constant, R.H. (1995). RAPD-PCR confirms absence of genetic variation between resistant variants of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera, Aphididae). The great Lakes Entomologist, 28, 127-133
- Antolin, M.F., Guertin, D.S., Petersen, J.J. (1996). The origin of gregarious *Muscidifurax* (Hymenoptera, Pteromalidae) in North America: an analysis using molecular markers. Biological Control, 6, 76-82
- Bellows, T.S., JR., Perring, T.M., Gill, R.J., Headrick, D.H. (1994). Description of a species of *Bemisia* (Homoptera, Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 87, 2, 195-206
- Black, IV, W.C. (1993). PCR with arbitrary primers: approach with care. Ins. Molec. Biol., 2, 1, 1-6
- Black, IV, W.C., Du Teau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, R.N., Pettorini, J.M. (1992). Use of random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids. Bull. Entomol. Res., 82, 151-159
- Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rosell, R.C. (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Ann. Rev. Entomol., 40, 511-534
- Burban, C. (1991). Structuration des populations chez un insecte polyphage: *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera, Aleyrodidae). Thèse doctorat. Université de Montpellier, France. 102 p.
- Byrne, F.J., Cahill, M., Denholm, I., Devonshire, A.L. (1995). Biochemical identification of interbreeding between B-type and non B-type strains of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. Biochem Genetics, 33, 13-23
- Cahill, M., Jarvis, W., Gorman, K., Denholm, I. (1996). Resolution of baseline responses and documentation of resistance to buprofezin in *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae). Bull. Entomol. Res., 86, 117-122

- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A. (1993). Identification of aphid (Homoptera, Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 86,545-550
- Felsenstein, J. (1992). Phylogenies from restriction sites: a maximum-likelihood approach. *Evolution*, 46,159-173
- Garner, K.J., Slavicek, J.M. (1996). Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing asian North American gypsy moths. *Insect Molec. Biol.*, 5,81-91
- Gawel, N.J., Bartlett, A.C. (1993). Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.*, 2,1,33-38
- Guirao, P., Beitia, F., Cenis, J.L. (1994). Aplicacion de la técnica RAPD-PCR a la taxonomia de moscas blancas (Homoptera, Aleyrodidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 20,757-764
- Laulier, M., Pradier, E., Bigot, Y., Périquet, G. (1995). An easy method for preserving nucleic acids in field samples for later molecular and genetic studies without refrigerating. *J. Evol. Biol.*, 8,657-663
- Kambhampati, Black, W.C., Rai, K.S. (1992). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) of mosquito species and populations (Diptera, Culicidae): techniques, statistical analysis and applications. *J. Medic. Entomol.*, 29,939-945
- Perring, T.M., Cooper, A., Kazmer, D.J. (1992). Identification of the poinsettia strain of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) on broccoli by electrophoresis. *J. Econ. Entomol.*, 85,4,1278-1284
- Post, R.J., Flook, P.K., Millest, A.L. (1993). Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Bioch. Syst. Ecology*, 21,85-92
- Stevens, J., Wall, R. (1995). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) in southern England. *Bull. Entomol. Res.*, 85,549-555
- Vanlerbergue-Masutti, F. (1994). Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera, Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP markers. *Insect Molec. Biol.*, 34,229-237
- Walsch, S.P., Metzger, D.A., Higushi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based typing from forensic material. *Biotechnic*, 10,506-513
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18,7213-7218
- Williams, C.L.S., Goldson, S.L., Baird, D.B., Bullock, D.W. (1994). Geographical origin of an introduced pest, *Listrotonus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity*, 72,412-419
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18,6531-6535
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Albright, D.G., Klein, T.A., Braun, M.J. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera, Culicidae, Anopheles). *Insect Molec. Biol.*, 1,205-211
- Wool, D., Calvert, L., Constantino, L.M., Bellotti, A.C., Gerling, D. (1994). Differentiation of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae) populations in Colombia. *J. Appl. Entomol.*, 117,122-134

2. ANALYSE DU POLYMORPHISME ET DU GENOTYPE DE DIFFERENTES SOUCHES DE *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA* ET D'*HARMONIA AXYRIDIS* (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE)

2.1. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE DEUX SOUCHES DE LA COCCINELLE *HARMONIA AXYRIDIS*.

Deux souches d'*H. axyridis* (Coleoptère, Coccinellidae), l'une sauvage et l'autre mutante, sélectionnée pour ses ailes non fonctionnelles après action d'un agent mutagène, ne sont pas différentes morphologiquement l'une de l'autre. Par des techniques de biologie moléculaire, il est possible de vérifier si génétiquement des différences existent et d'évaluer le polymorphisme de chaque souche. La technique employée dans le cas présent a été celle du RAPD-PCR.

Matériel et méthodes:

Les échantillons de coccinelles ont été conservées dans l'azote liquide dès leur réception.

10 individus ont été prélevés au hasard dans le cas de la souche sauvage et 12 dans le cas de la souche mutante.

L'ADN génomique de chaque individu a été extrait au phénol/chloroforme puis précipité à l'éthanol. Après centrifugation, l'ADN a été séché à l'air libre et repris dans 80 µl d'une solution aqueuse. L'ADN présent dans cette solution a été quantifié par spectrophotofluorométrie. L'ADN à analyser est mis en solution dans un tampon 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl en présence de bisbenzimidazole (Hoescht 33258). Ce fluochrome, qui a une forte affinité avec l'ADN avec lequel il se combine, est excité par une longueur d'onde de 365 nm et l'intensité de la lumière émise à une longueur d'onde de 460 nm est mesurée.

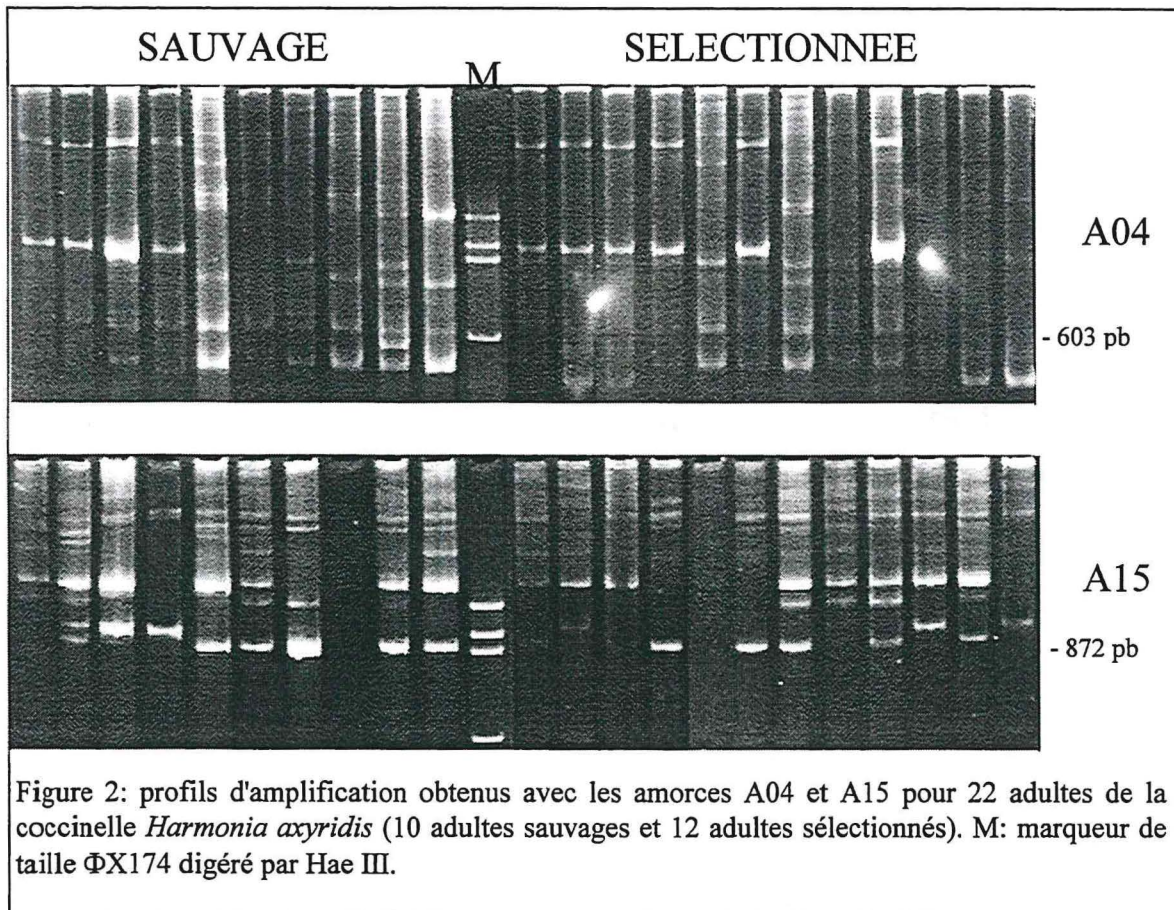
Huit amorces ont été utilisées à une concentration finale de 0.6 μ M:

code	nbre nucléotides	%G/C	Séquence
A01	10	70	CAGGCCCTTC
A02	10	70	TGCCGAGCTG
A04	10	60	AATCGGGCTG
A09	10	70	GGGTAACGCC
A13	10	70	CAGCACCCAC
A15	10	60	TTCCGAACCC
A17	10	60	GACCGCTTGT
A19	10	60	CAAACGTCGG

Résultats obtenus:

Par spectrophotofluorométrie, il a été trouvé une quantité d'ADN par individu variant de 720 à 3600 ng. Cette amplitude peut provenir de variations dans la qualité de l'extraction de l'ADN entre les différents individus. 1,5 μ l de la solution d'ADN ont été utilisés par individu pour chaque amplification.

Sur les 8 amorces testées, 6 ont donné des amplifications qui ont permis l'analyse des profils: il s'agit des amorces A01, A02, A04, A13, A15 et A19. Les profils des PCR obtenus avec les amorces A04 et A15 sont illustrés dans la figure 2 ci-dessous.



Pour comparer le polymorphisme des deux souches, les profils obtenus avec les différentes amorces ont été observés. Nous avons sélectionné les bandes les plus visibles obtenues dans les différents profils.

Pour chaque individu, la présence ou l'absence des bandes sélectionnées a été notée. La méthode de l'analyse de la similarité des deux souches compare de proche en proche le profil de deux individus et prend en compte le ou les bandes qu'ils ont en commun (ou qu'ils n'ont pas tous les deux). Ainsi tous les individus de chaque souche ont été comparés deux à deux.

Par exemple, dans le cas de l'amorce A15, 4 bandes ont été sélectionnées et concernant la souche sauvage, le 1er et le 2ème individu (appariement 1) ont 2 bandes présentes en commun (soit un coefficient de similarité de $2/4$), le 1er et le 3ème (appariement 2) ont 1 bande présente en commun ($1/4$) et 1 bande absente en commun ($1/4$)...Le coefficient de similarité M est la somme des moyennes des bandes communes pour chaque appariement divisée par le nombre total d'appairements. Si $M = 1$, la souche est monomorphe.

Il y a 2 coefficients M possibles selon que l'on tienne compte seulement des bandes présentes en commun chez 2 individus ou bien des bandes à la fois présentes et absentes en commun chez ces 2 individus.

L'analyse des bandes obtenus avec ces 6 amorces (29 bandes analysées au total) a permis d'obtenir les coefficients de similarité M suivants:

	présence en commun de bandes	présence et absence en commun de bandes
souche sauvage:	0,41	0,58
souche mutante:	0,34	0,61

Il ne semble pas y avoir de différences dans le polymorphisme entre les deux souches car si l'on ne tient compte que des bandes présentes que les individus ont en commun, on remarque que le coefficient tend à diminuer entre la souche sauvage et la souche mutante mais tend plutôt à augmenter si l'on tient compte à la fois des bandes présentes et absentes en commun. On peut donc en conclure que la sélection ne s'est pas accompagnée d'une modification du polymorphisme.

D'autre part, il n'a pas été observé, avec les amorces testées, de bandes spécifiques de l'une ou l'autre des deux souches. La mutagenèse n'aurait donc pas généré une profonde modification du génome qui aurait pu se matérialiser dans les profils obtenus avec la souche mutante non seulement par des bandes permettant de la différencier de la souche sauvage mais aussi par un grand nombre de bandes. Toutefois, un essai avec un plus grand nombre d'amorces serait nécessaire pour détecter éventuellement de telles caractéristiques.

2.2. CARACTERISATION DU GENOTYPE DE LA DESCENDANCE DU CROISEMENT *HARMONIA AXYRIDIS* X *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA*

Un croisement entre deux espèces, un **mâle** de *C. septempunctata* et une **femelle** d'*H. axyridis*, a donné des individus dont le phénotype est identique à celui du parent mâle (*C.*

sempunctata) en ce qui concerne les caractères morphologiques et de spécificité alimentaire.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à cette observation:

- soit il y a eu exclusion du génome de la femelle lors de la fécondation (hybridogénèse) et dans ce cas les descendants issus de ce croisement ne comporteraient que le génome du père (*C. sempunctata*). En biologie, les cas d'exclusion de l'un des génomes sont très rares. Ragghianti *et al.* (1995) rapportent trois cas qui concernent un poisson du genre *Poeciliopsis*, un batracien du genre *Rana* (grenouille) et un insecte du genre *Bacillus* (Phasmatodea). La grenouille, *Rana esculenta*, hybride entre *R. ridibunda* et *R. lessonae*, possède uniquement le génome de *R. ridibunda* (Graf et Müller, 1979). Même dans le cas d'une exclusion génomique, le génome mitochondrial proviendra de la mère (*H. axyridis*).

- soit il y a une dominance pour tous les caractères analysés, on aura alors les deux génomes du père et de la mère et l'ADN mitochondrial de la mère.

- soit la descendance provient d'une femelle de *C. sempunctata* et non d'une femelle d'*H. axyridis*. Dans ce cas le génome mitochondrial sera celui de *C. sempunctata*.

Nous avons essayé de comprendre l'originalité du résultat de ce croisement interspécifique par des techniques de biologie moléculaire. Nous avons utilisé la technique RAPD-PCR pour connaître l'origine du génome puis la technique du CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) sur ADN mitochondrial pour identifier l'origine maternelle de la progéniture.

Matériel animal: :

- *H. axyridis*: souche sauvage (SAUV) , souche sélectionnée (SELE) ayant naturellement des ailes non fonctionnelles, souche mutante (MUTA) ayant été sélectionnée pour ses ailes non fonctionnelles après action d'un agent mutagène
- *C. sempunctata*: souche sauvage (C7P)

- F2: descendant du croisement entre individus de la génération F1 issue du croisement entre un mâle de *C. septempunctata* avec une femelle d'*H. axyridis* (F2)

Dans cette expérience, nous n'avons pu disposer d'individus de la génération F1.

- Origine du génome nucléaire dans la F2:

- a. extraction de l'ADN génomique (nucléaire et cytoplasmique):

L'ADN génomique a été obtenu en broyant dans une solution contenant 10% de CHELEX (résine chélatante) les 6 pattes de chaque individu. Le broyat est mis à incuber 30 minutes à 55°C puis 10 minutes à 100°C. L'ADN en solution est récupérée après centrifugation à 15000 t/min. pendant 10 minutes.

- b. amplification PCR:

La technique RAPD-PCR a été employée. Deux amorces ont été utilisées: A14 (TCTGTGCTGG) et A16 (AGCCAGCGAA). Les conditions PCR ont été les suivantes: [10 secondes à 94°C / 30 secondes à 36°C / 1 minute à 72°C] x 40 cycles.

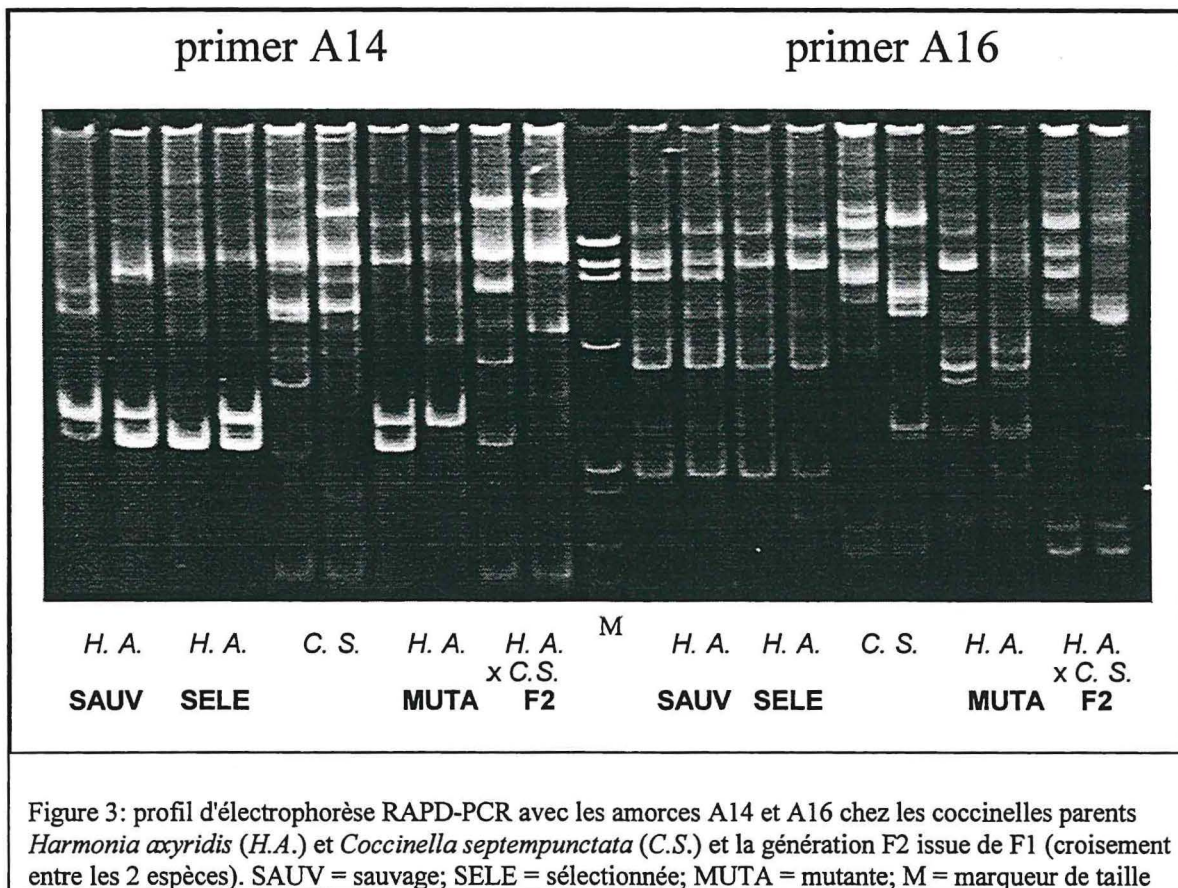
Les réactions PCR ont été effectuées sur deux individus pour chacune des souches.

Les fragments obtenus ont été visualisés après migration par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 8% du produit de l'amplification et révélation sous lumière UV des gels colorés au bromure d'éthidium. Chaque gel comporte le marqueur moléculaire FC174 digéré par Hae III (M).

- c. résultats:

Les profils obtenus (figure 3) font clairement apparaître des bandes communes entre les individus en F2 et le mâle fondateur (*C. septempunctata*). Les individus en F2 semblent

donc posséder le génotype de *C. septempunctata*. Mais avant d'avancer l'hypothèse d'exclusion de l'un des génomes, il y a lieu d'effectuer des vérifications. L'une d'elles consiste à s'assurer de l'origine maternelle du génome mitochondrial.



• Origine du génome mitochondrial de la génération F2:

L'ADN mitochondrial a la particularité d'avoir une hérédité cytoplasmique et, dans la très grande majorité des cas, de n'être transmis que par la femelle. Dans le cas d'un croisement entre deux espèces, il est ainsi possible de vérifier l'origine maternelle des mitochondries même dans le cas d'exclusion du génome de la femelle. Dans le cas présent, nous avons eu la possibilité en analysant un gène de l'ADN mitochondrial de savoir si les mitochondries des individus F2 provenaient bien d'*Harmonia axyridis*.

a. amplification par PCR de fragments du gène codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COI) mitochondriale:

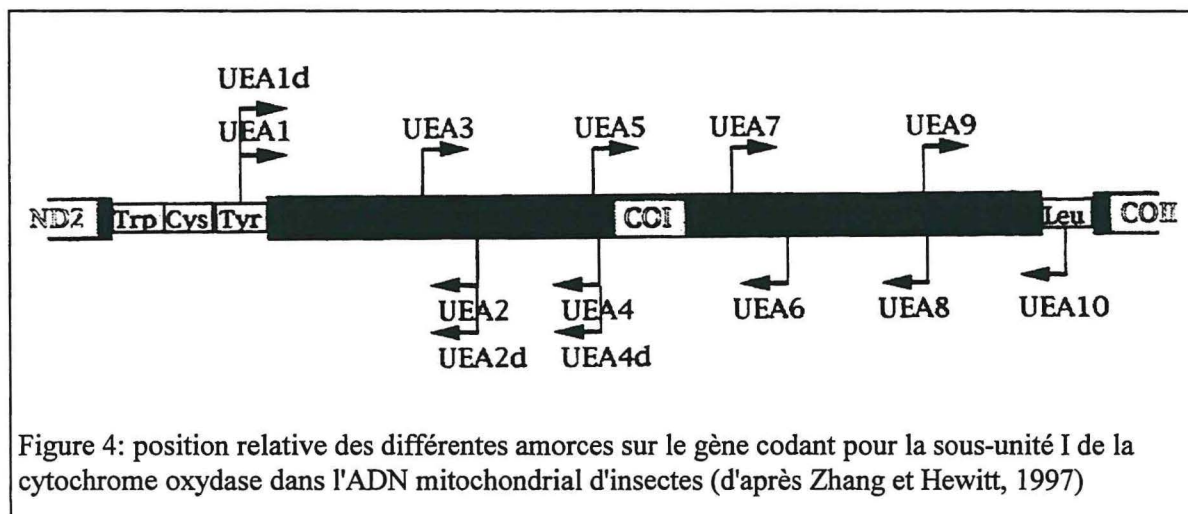
Plusieurs sondes spécifiques de cette enzyme sont connues dans la littérature (Zhang et Hewitt, 1997) et utilisées pour amplifier le gène codant pour cette enzyme. Nous avons utilisé dans cette étude les amorces suivantes (figure 4):

UEA3: 5' TAT AGC ATT CCC ACG AAT AAA TAA 3'

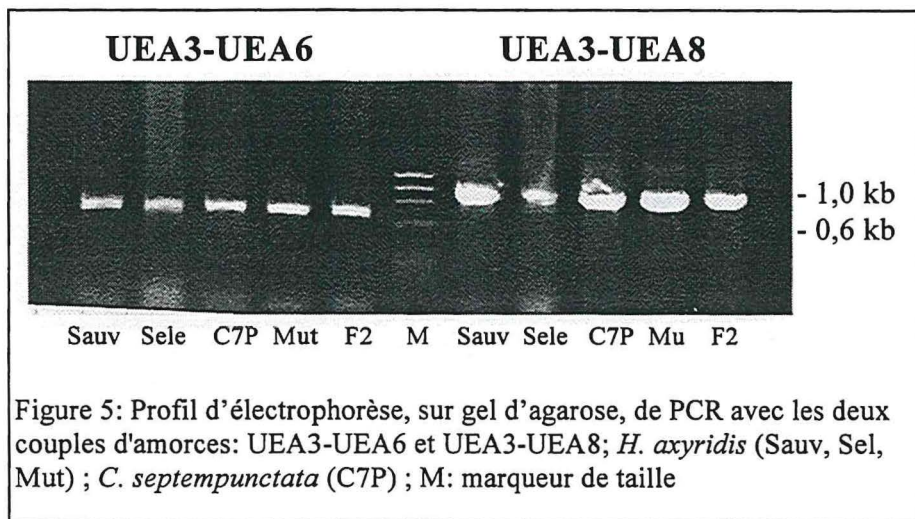
UEA6: 5' TTA ATW CCW GTW GGN ACN GCA ATR ATT AT 3'

UEA8 5' AAA AAT GTT GAG GGA AAA ATG TTA 3'.

La taille attendue du fragment UEA3-UAE8 est de 1020 pb et 690 pb avec UEA3-UEA6. Les amplifications ont été réalisées sur l'ADN extrait de pattes de quatre individus par souche par la technique d'extraction au CHELEX.



Les conditions PCR ont été les suivantes: [10 secondes à 94°C / 60 secondes à 40°C / 90 secondes à 72°C] x 40 cycles. Les résultats de l'amplification (un individu par souche) sont illustrés dans la figure 5 ci-dessous.



b. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) sur les produits d'amplification:

Les produits de l'amplification UEA3-UEA8 ont été digérés pendant une heure à 37°C avec différentes enzymes de restriction selon la technique du CAPS (Tagu, 1999).

Aucun site de coupure n'a été observé avec Dra I (coupure: TTT'AAA; probabilité de coupure: $1/4^6$) et Ssp I (coupure AAT'ATT; probabilité de coupure: $1/4^6$). Des sites de coupure existent avec Rsa I (coupure GT'AC; probabilité de coupure: $1/4^4$). Les résultats des digestions avec Rsa I effectuées sur les produits PCR pour quatre individus par souche sont exposés dans la figure 6 ci-dessous :

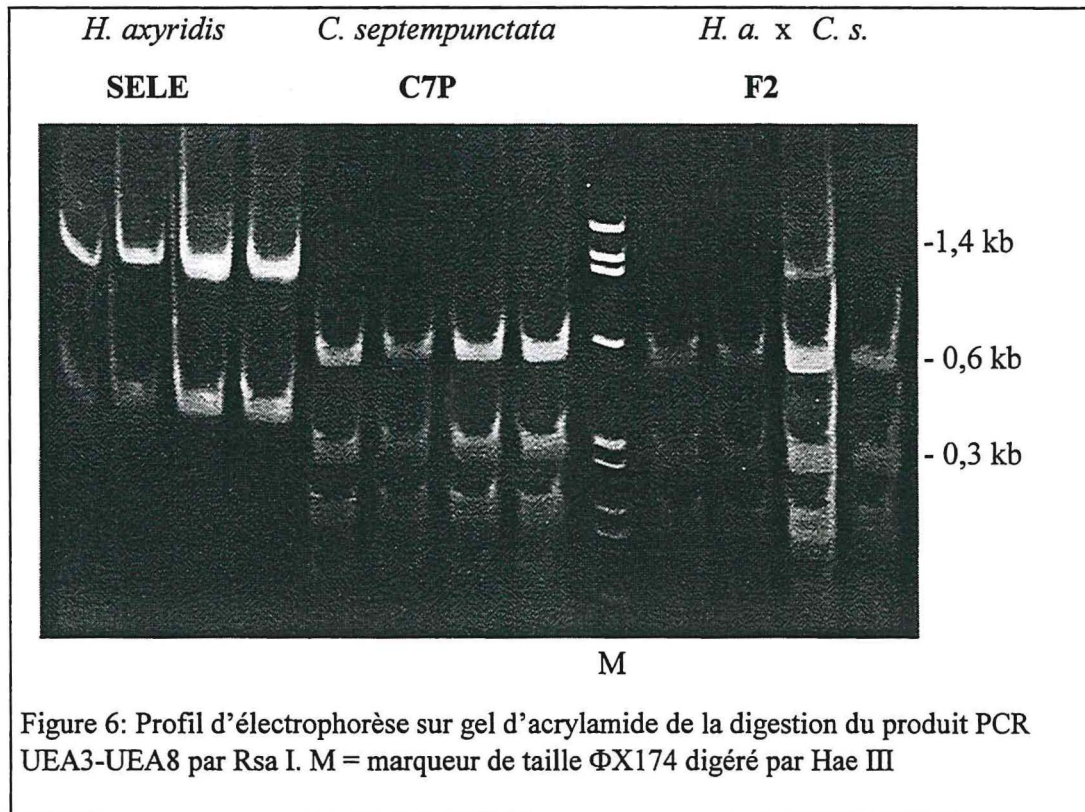


Figure 6: Profil d'électrophorèse sur gel d'acrylamide de la digestion du produit PCR UEA3-UEA8 par Rsa I. M = marqueur de taille Φ X174 digéré par Hae III

Conclusion:

Les profils d'électrophorèse indiquent clairement que les mitochondries sont héritées de femelles de *Coccinella septempunctata* et non de femelles d'*Harmonia axyridis*, et ce quel que soit l'individu. Il semblerait que l'on ait tout simplement en F2 des individus issus d'un croisement entre deux individus appartenant à l'espèce *C. septempunctata*. Ce résultat confirme bien les résultats des RAPD (le génotype des F2 est bien celui de *C. septempunctata*) mais met en doute la possibilité d'une exclusion du génome de la femelle d'*H. axyridis*.

On peut raisonnablement supposer qu'il y a eu une incursion de femelles de *C. septempunctata* au cours de l'expérience.

Avant d'être si catégorique, il serait nécessaire de vérifier ces résultats car il se peut que ce phénomène d'exclusion de l'un des génomes ait bien eu lieu mais qu'il ait été occulté par cette contamination.

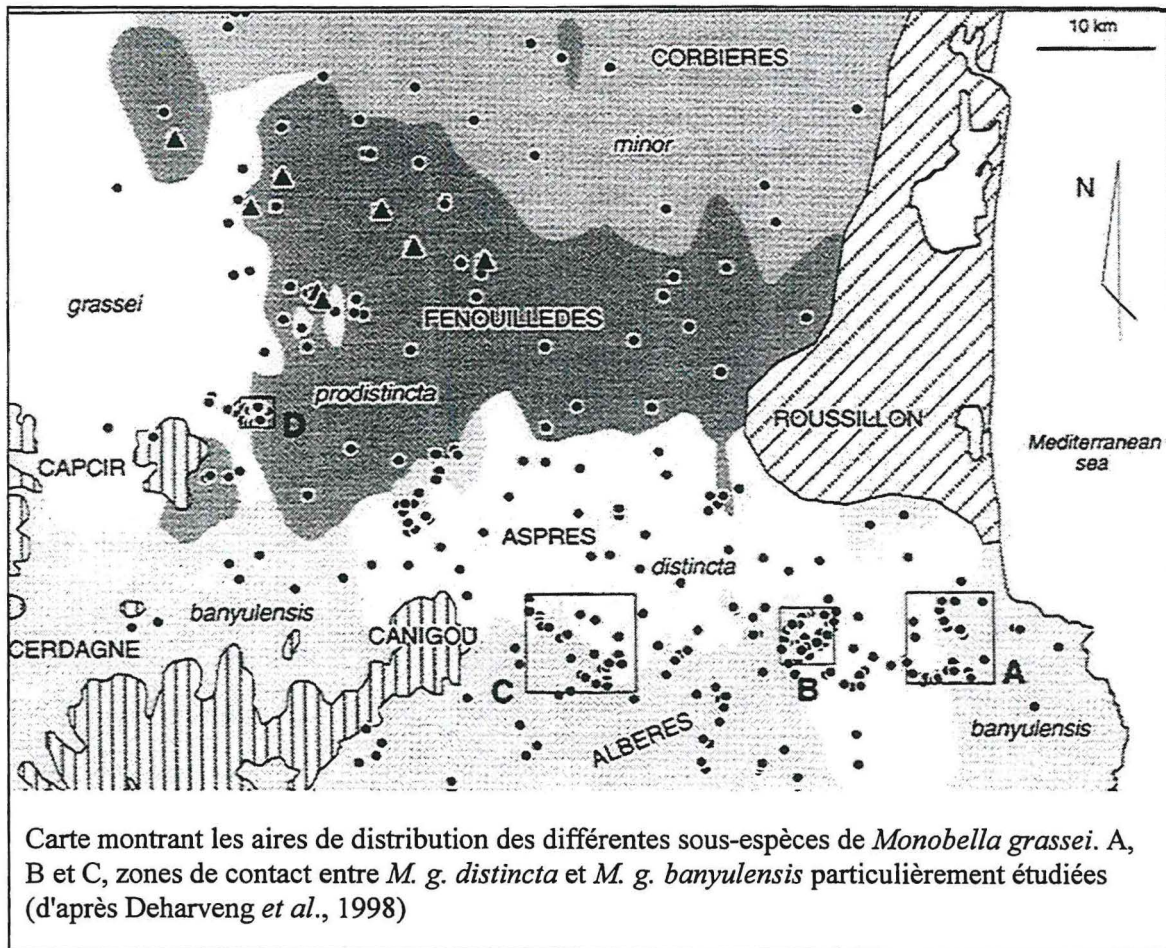
3. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES INDIVIDUS D'UNE ZONE DE CONTACT ENTRE DEUX SOUS-ESPECES DE L'ESPECE *MONOBELLA GRASSEI* (COLLEMBOLA, NEANURIDAE).

L'étude des zones de contact entre des organismes très proches entre eux est une source d'informations permettant de mieux comprendre les processus de spéciation. Chez les collemboles du genre *Monobella*, dont le mode de spéciation est de type parapatrique, on s'attend à l'existence de zones de contact, dites zones de tension ou zones hybrides dans le cas de distributions parapatriques, très étroites (de l'ordre de quelques centaines de mètres à quelques kilomètres) en raison de la faible mobilité de ces organismes.

Key (1981) cité par Rougerie (1997) donne de la parapatrie la définition suivante: distribution dans laquelle deux populations occupent des territoires contigus qui se chevauchent seulement très étroitement, et caractérisée à la fois par la longueur de la zone de chevauchement et la mobilité des individus.

Dans ces zones de contact, la parapatrie serait une parapatrie par hybridation où chaque population empêcherait l'autre de pénétrer son territoire en se croisant avec elle. Selon l'hypothèse la plus courante, la parapatrie se maintiendrait par l'incapacité des hybrides à produire une descendance suffisamment viable.

Des zones hybrides ont été identifiées pour plusieurs sous-espèces de l'espèce *Monobella grassei* que l'on rencontre dans le sud de la France (Deharveng *et al.*, 1998). Concernant les sous-espèces *M. g. distincta* et *M. g. baryulensis* que l'on rencontre dans les Pyrénées Orientales, trois zones de contact (A, B et C) ont été étudiées plus particulièrement (voir carte ci-dessous).



Ces sous-espèces ne se distinguent que par des caractères morphologiques relativement minimes (forme des tubercules dorsaux, présence de certaines soies). Par ailleurs, un certain polymorphisme au sein du genre *Monobella* a été noté (Bedos et Deharveng, 1998). Les techniques de caractérisation moléculaire peuvent être un outil permettant d'une part de préciser la position taxonomique du genre *Monobella* et d'autre part de caractériser les individus dans les zones de contact et d'apprécier dans ces zones les niveaux d'échanges géniques entre les populations.

Dans le cadre de cette étude concernant les zones hybrides entre les sous-espèces *distincta* et *banyulensis*, 46 échantillons collectés dans neuf localités situées dans les Pyrénées Orientales ont été caractérisés par RAPD-PCR. La zone de contact concernée a été la zone A (voir carte ci-dessus). Des travaux complémentaires ont concerné 24 échantillons représentatifs des trois zones: zone à *M. g. distincta*, zone à *M. g. banyulensis* et zone

hybride, parmi les 46 échantillons (figure 7). Pour ces échantillons, la variabilité du gène codant pour la cytochrome oxydase II mitochondriale a été analysée dans le but de caractériser les échantillons des zones hybrides.

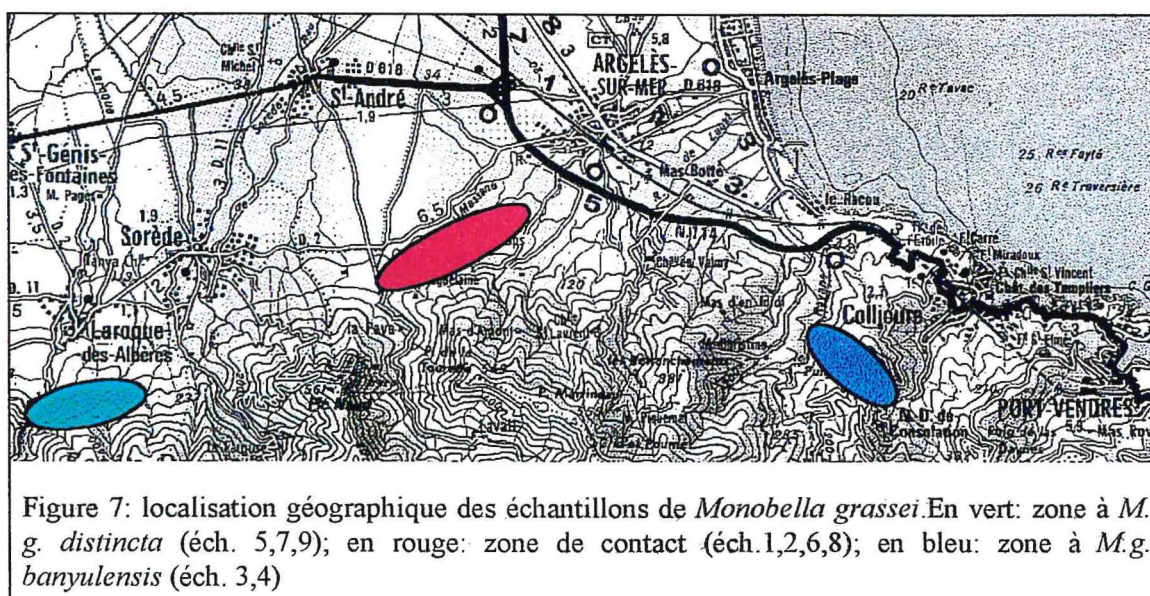
3.1. CARACTERISATION MOLECULAIRE PAR RAPD-PCR

- Matériel et méthodes:

- a. échantillons analysés:

Les échantillons ont été récoltés en 1998 par David Porco, étudiant en D.E.S.U..

localité	code localité	nombre individus	code individus	zone
Sorède	1	6	1.1,1.2,1.3,1.4,1.5,1.6	hybride
Mas Plage Torte	2	5	2.1,2.2,2.3,2.4,2.5	hybride
N.D. de Consolation	3	6	3.1,3.2,3.3,3.4,3.5,3.6	banyulensis
Le Rimbaut	4	6	4.1,4.2,4.3,4.4,4.5,4.6	banyulensis
Chapelle Roca Vella	5	6	5.1,5.2,5.3,5.4,5.5,5.6	distincta
Maison de retraite Les Capucines	6	6	6.1,6.2,6.3,6.4,6.5,6.6	hybride
Mas Malzac	7	3	7.1,7.2,7.3	distincta
Maison de retraite Les Capucines	8	2	8.1,8.2	hybride
Mas Malzac	9	6	9.1,9.2,9.3,9.4,9.5,9.6	distincta



b. extraction de l'ADN génomique (nucléaire et cytoplasmique):

L'ADN génomique a été obtenu en broyant un individu dans une solution contenant 10% de CHELEX (résine chélatante). Le broyat est mis à incubé 30 minutes à 55°C puis 10 minutes à 100°C. L'ADN en solution dans 50 µl est récupérée après centrifugation à 15000 t/minute pendant 10 minutes.

c. amplification RAPD-PCR:

Onze amorces décarnères (concentration finale 0.6 µM) ont été testées à des conditions PCR variables du point de vue de la température d'hybridation et de la concentration en dNTP (tableau X). Les conditions PCR ont été les suivantes: [10 secondes à 94°C / 30 secondes à 36°C ou 46°C / 1 minute à 72°C] x 40 cycles. Les amplifications par PCR ont été effectuées chaque fois sur les 46 échantillons dans l'appareil PCR Perkin Elmer 9700. Les produits PCR ont été visualisés après migration sur gel d'acrylamide 8% et révélation sous lumière U.V. des gels colorés au bromure d'éthidium.

Amorce	séquence nucléotidique	température d'hybridation (°C)	concentration en dNTP (mM)
A01	CAGGCCCTTC	36 - 46	0.25
A03	AGTCAGCCAC	46	0.1
A04	AATCGGGCTG	46	0.1
A06	GGTCCCTGAC	41	0.1
A07	GAAACGGGTG	36	0.15
A12	TCGGCGATAG	41	0.1
A13	CAGCACCCAC	36 - 40	0.1
A15	TTCCGAACCC	46	0.1
A18	AGGTGACCGT	46	0.1
A19	CAAACGTTCGG	36 - 40	0.15 - 0.25
A20	GTTGCGATCC	36 - 46	0.1 - 0.15

• Résultats:

a. profils d'amplification obtenus:

Des 11 amorces testées, 5 ont permis l'analyse des profils d'amplification des 46 échantillons. Il s'agit des amorces A01, A12, A13, A15 et A20 (figures 8 et 9). L'augmentation de la température d'hybridation associée ou non à la diminution de la concentration en dNTP a permis une certaine diminution du nombre de bandes amplifiées, afin de pouvoir identifier plus facilement les bandes discriminantes. Pour chaque PCR, deux migrations sur deux gels différents ont été nécessaires, chaque gel ne disposant que de 25 puits, ce qui a compliqué l'alignement des profils et le choix des bandes.

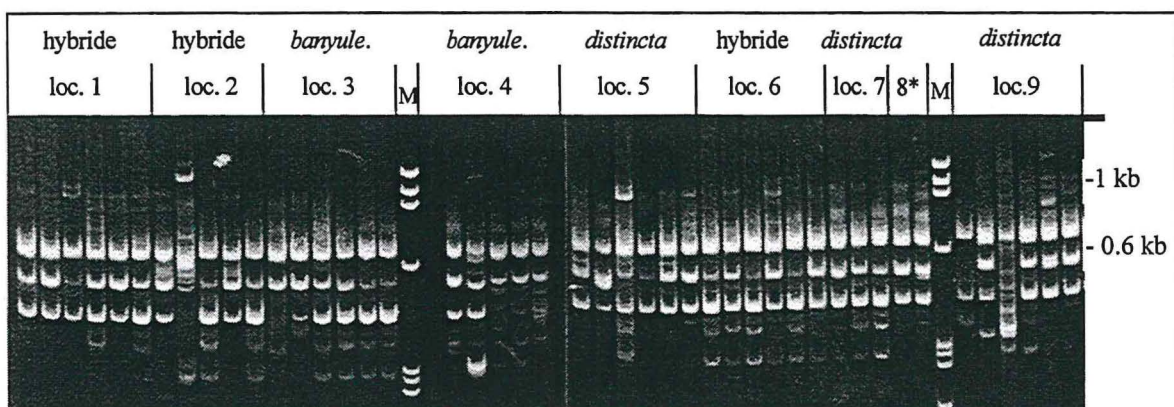
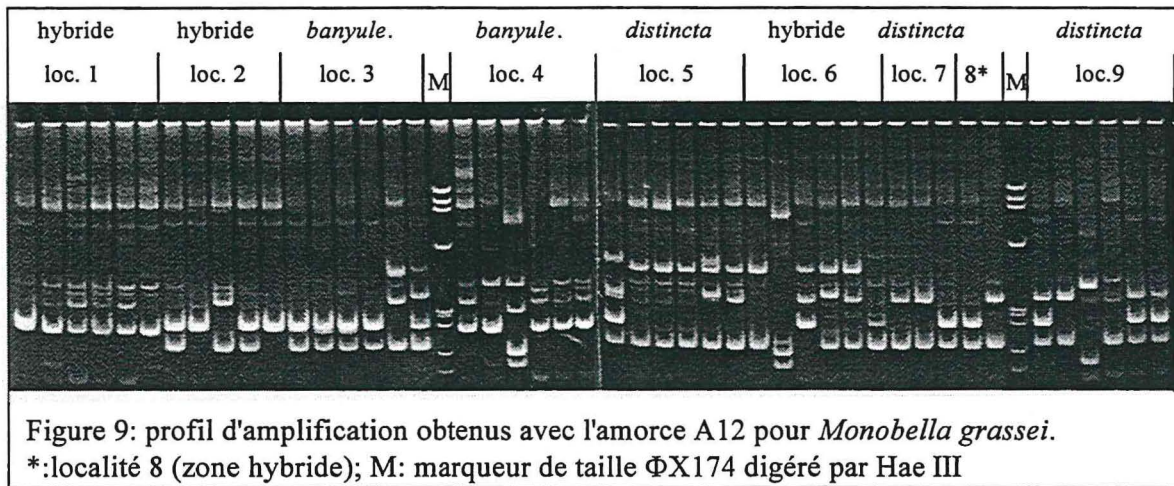


Figure 8: profil d'amplification obtenus avec l'amorce A01 pour *Monobella grassei*.

*: localité 8 (zone hybride); **: M: marqueur de taille Φ X174 digéré par Hae III



b. phénogramme:

Au total, 18 bandes ont été retenues pour la construction du phénogramme. Les échantillons 4.3 et 9.3 ont été éliminés en raison de leur profil trop différent des autres échantillons. Il est possible que ces échantillons ne correspondent pas à l'espèce étudiée.

La construction du phénogramme a suivi les mêmes procédures que dans le cas de *Bemisia tabaci*.

Le phénogramme obtenu (figure 10) met en évidence un polymorphisme élevé entre les individus. Il n'a pas été retrouvé un groupe homogène pour chacune des deux sous-espèces *distincta* et *banyulensis*. Seuls les échantillons de la localité pT1 située dans une zone de contact semblent relativement homogènes (coefficient de similarité: 0.40) mais ne semblent appartenir à aucune des deux sous-espèces.

Trois échantillons se distinguent manifestement de l'ensemble des autres échantillons: 5.2, 4.1 et 2.2, chacun appartenant à un groupe différent. Ici encore, il semble raisonnable de penser que ces échantillons pourraient appartenir à une ou des espèces différentes.

- Conclusion:

Le polymorphisme observé dans les deux sous-espèces, assez surprenant pour des organismes peu mobiles, ne permet pas de positionner d'un point de vue taxonomique les échantillons des zones de contact. Néanmoins, les échantillons de la localité pT1 (Sorède), relativement homogènes entre eux et éloignés des autres échantillons, tendraient à confirmer la présence d'un groupe individualisé dans cette localité.

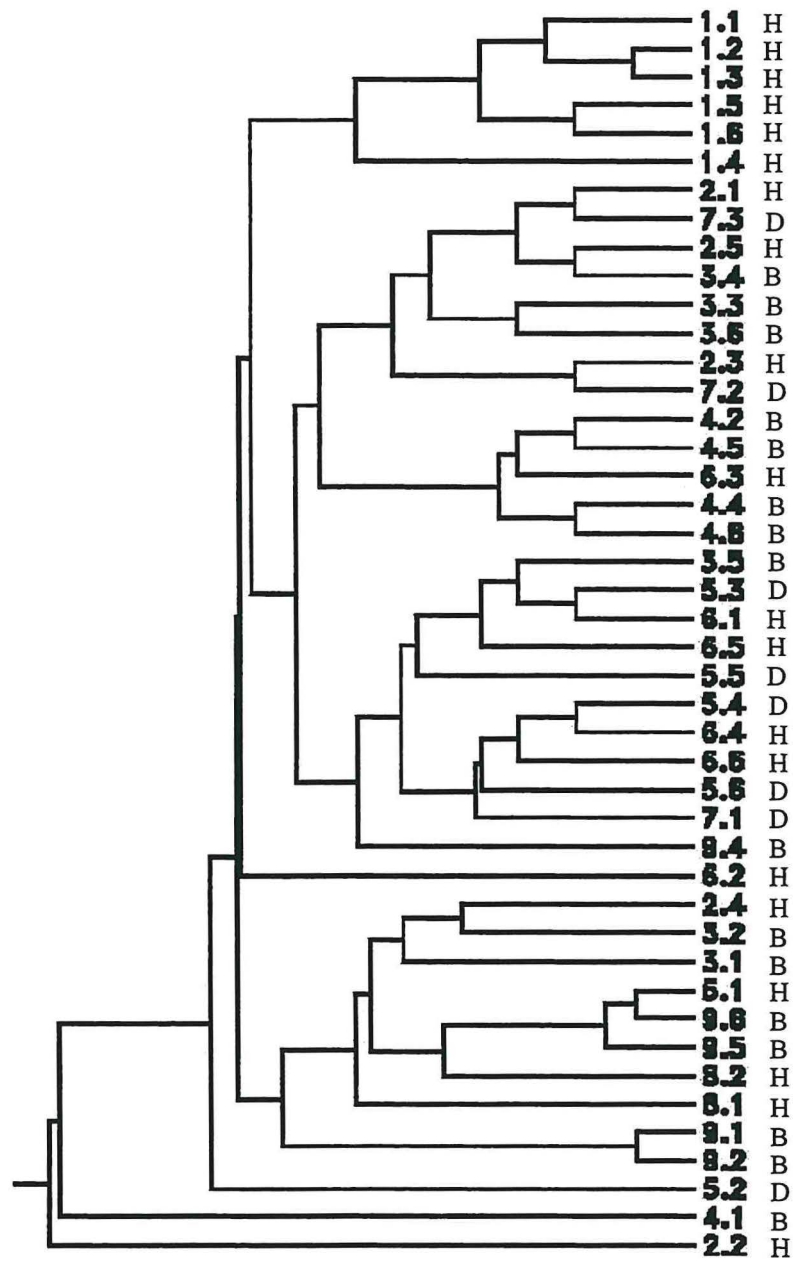


Figure 10: phénogramme des 44 échantillons du collembole *Monobella grassei*. (18 fragments obtenus avec 5 amorces). D = sous-espèce *distincta*; B = sous-espèce *banyulensis*; H = échantillons de zones hybrides

3.2. ETUDE DE LA VARIABILITE DU GENE CODANT POUR LA SOUS-UNITE II DE LA CYTOCHROME OXYDASE MITOCHONDRIALE.

Les caractéristiques propres à l'ADN mitochondrial sont mises à profit pour apprécier les relations phylogénétiques d'insectes appartenant à des groupes taxonomiques différents. Frati *et al.* (1997) ont séquencé le gène codant pour la sous-unité II de la cytochrome oxydase mitochondriale dans le but de retracer l'évolution des collemboles. Cette stratégie est bien adaptée pour comparer des espèces différentes. Mais dans le cas d'analyses intra-spécifiques, cette stratégie peut ne pas être adaptée, la variabilité de l'ADN mitochondrial pouvant être trop faible. Néanmoins cette stratégie a été reprise dans le cas de l'espèce *Monobella grassei* dans l'objectif de caractériser les échantillons des zones hybrides.

- Matériel et méthodes:

Dans un premier temps, nous avons tenté de cloner le gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase, en se référant aux travaux concernant les coccinelles *Coccinella septempunctata* et *Harmonia axyridis* quant aux conditions PCR. Mais aucune amplification n'a pu être obtenue.

Par contre, le gène codant pour la sous-unité II de cette enzyme a pu être amplifié par PCR selon le protocole utilisé par Frati *et al.* (1997).

Deux amorces flanquant le gène (dont la taille est de 690 pb) ont été utilisées:

TL2-J-3037-modifiée: 5' AATATGGCAGATTAGTGCA 3'

TK-N-3785-modifiée: 5' GTTTAAGAGACCAGTACTT 3'

ainsi que deux amorces internes au gène:

C2-N-3389-modifiée: 5' TCAATATCATTGATGTCC 3'

C2-N-3661: 5' GCTCCACAAATTTCTGAACA 3'

Les conditions PCR ont été les suivantes: [10 secondes à 94°C / 1 minute à 45°C / 90 secondes à 72°C] x 40 cycles. Les amorces ont été employées à 0.4 µM.

Les produits d'amplification non purifiés ont été digérés avec différentes enzymes: Rsa I (coupure GT'AC), Alu I (coupure AG'CT), Tsp 509 I (coupure 'AATT), Dra I

(TTT'AAA) et Mse I (coupure T'TAA) selon la technique CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). Les produits de la digestion enzymatique ont été analysés après migration sur gel d'acrylamide 8%.

- Résultats:

24 échantillons ont été analysés: 6 pour la zone à *M. g. distincta* (individus: 5.1 à 5.6), 10 pour la zone à *M. g. banyulensis* (individus 3.1 à 3.6 et 4.1 à 4.4) et 8 pour la zone de contact (individus 1.1, 1.2, 1.5, 1.6, 2.1, 2.3, 2.4, 2.5).

Le couple d'amorces TL2-J-3037-modifiée - C2-N-3661 a permis l'amplification d'un fragment du gène (de 670 pb environ). Les CAPS effectués sur ce fragment amplifié (figure 12) ont permis de mettre en évidence que l'échantillon 4.3 originaire de la zone à *M. g. banyulensis* se distinguait des autres individus quel que soit la zone de collecte confirmant les résultats obtenus par RAPD-PCR où déjà cet individu avait été écarté. Excepté cet échantillon, que l'on suppose éloigné des autres d'un point de vue taxonomique, les échantillons, quelle que soit la zone, ne se différencient pas les uns des autres si l'on se réfère aux profils obtenus avec les enzymes Rsa I, Alu I, Mse I et Tsp 509I. Quel que soit l'échantillon, il n'a pas été observé de coupure avec l'enzyme Dra I. La digestion des fragments amplifiés par l'enzyme Rsa I a été incomplète dans plusieurs échantillons certainement en raison de l'absence de purification des produits d'amplification. 5 adultes de *Monobella grassei* en provenance de Dordogne ont été comparés avec certains échantillons des Pyrénées Orientales (figure 11). Les CAPS avec Rsa I et Alu I indiquent clairement que les individus de Dordogne sont bien distincts de ceux des Pyrénées Orientales, quelle que soit la zone de collecte. Il n'y aurait donc pas concordance pour les caractères pris en compte entre le polymorphisme morphologique et celui mis en évidence au niveau moléculaire.

- Conclusion:

Avec les différentes enzymes de restriction, il n'a pas été possible de caractériser les échantillons de la zone de contact. D'autres enzymes de restriction pourraient être testées ou mieux encore, la comparaison des séquences nucléotidiques du gène codant pour la

cytochrome oxydase II pourrait être faite. Mais il y a de grandes chances pour que la variabilité intra-spécifique du gène codant pour une des sous-unités de la cytochrome oxydase mitochondriale soit trop faible pour pouvoir distinguer des sous-espèces voire des biotypes alors que la technique RAPD-PCR, dans le cas des collemboles, a montré un polymorphisme exacerbé non interprétable.

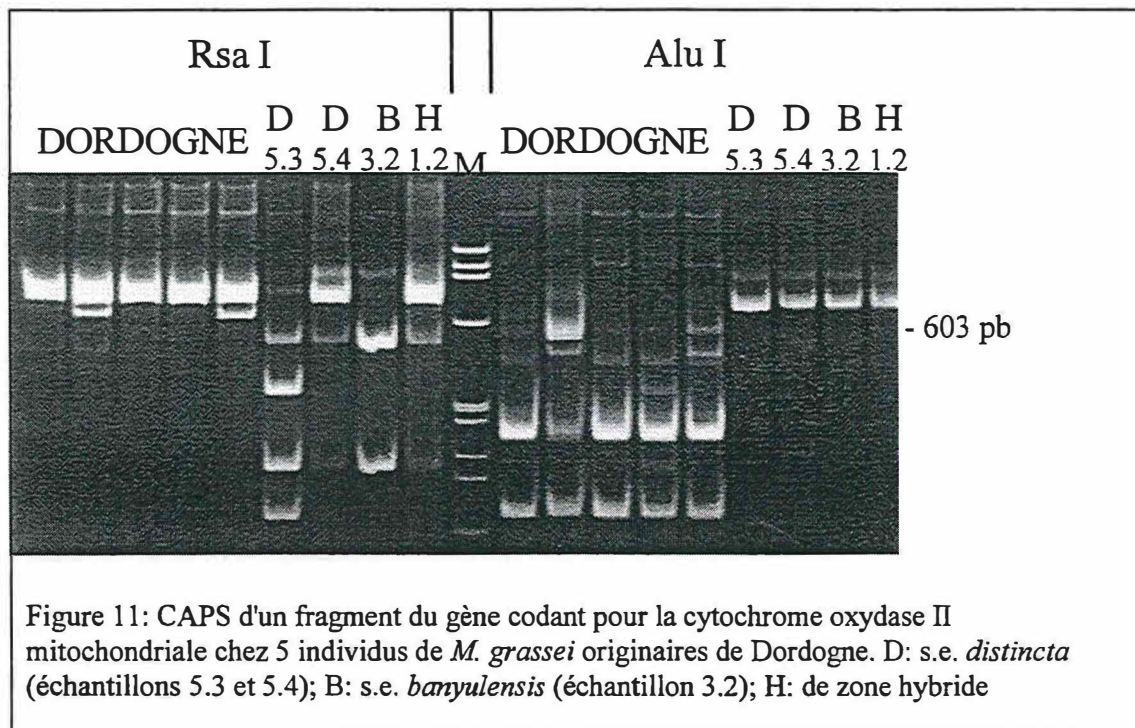
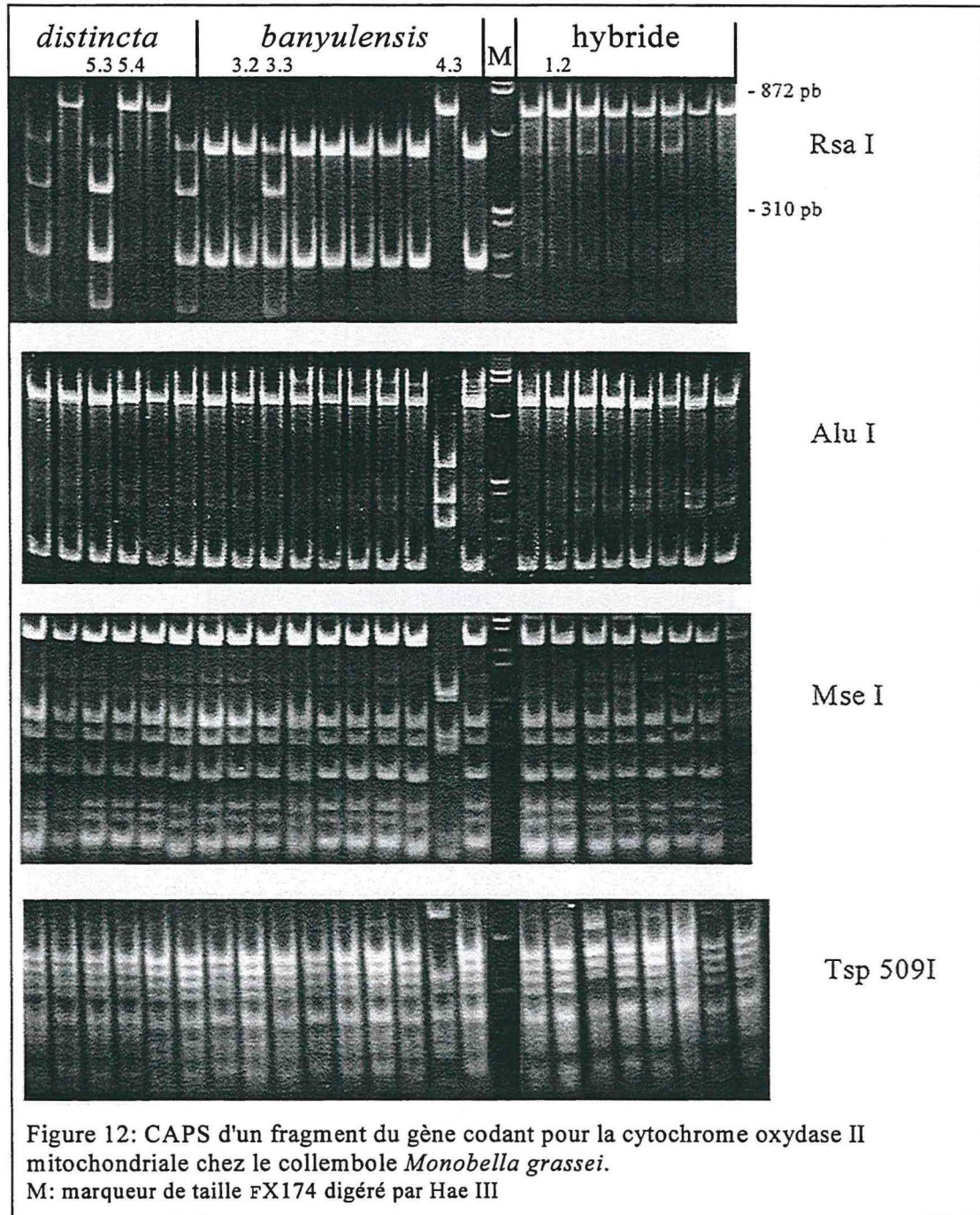


Figure 11: CAPS d'un fragment du gène codant pour la cytochrome oxydase II mitochondriale chez 5 individus de *M. grassei* originaires de Dordogne. D: s.e. *distincta* (échantillons 5.3 et 5.4); B: s.e. *banyulensis* (échantillon 3.2); H: de zone hybride



CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Dans le cadre des travaux de caractérisation d'insectes, deux techniques de biologie moléculaire ont été utilisées:

La technique RAPD - PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction). Cette technique PCR consiste à amplifier des fragments d'ADN génomique en utilisant une seule amorce de dix bases arbitraires. Elle ne nécessite pas d'informations préalables sur le génome ni de préparations élaborées des échantillons.

Cette technique a permis de mettre en évidence chez l'aleurode *Bemisia tabaci* que le biotype "B", qui cause de sévères dégâts aux Etats Unis et dans les Caraïbes, n'a pas envahi le monde entier. Ce biotype n'a été observé que sur les échantillons de Martinique, du Paraguay et de France. En Afrique (Cameroun, Sénégal, Côte d'Ivoire) et en Amérique centrale (Nicaragua), plusieurs biotypes ont été caractérisés. Il sont principalement associés à la plante-hôte.

Par RAPD - PCR, il a été montré que le polymorphisme d'une souche de la coccinelle *Harmonia axyridis* sélectionnée pour ses ailes non fonctionnelles, conséquence de l'action d'un agent mutagène, ne diffère pas de celui de la souche sauvage.

Les collemboles d'une zone de contact entre deux sous-espèces *Monobella grassei distincta* et *M. grassei banyulensis* n'ont pu être caractérisés. Le phénogramme obtenu à partir des profils d'amplification des RAPD-PCR a montré un polymorphisme élevé aussi bien dans les échantillons récoltés dans la zone de contact que dans ceux correspondant à chacune des deux sous-espèces. Ce polymorphisme n'a pas permis de préciser la position taxonomique des individus de la zone de contact.

la technique du CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). Cette technique consiste à digérer par des enzymes de restriction un fragment d'ADN génomique amplifié par PCR avec des amorces spécifiques d'un gène. L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments du gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase mitochondriale a permis d'infirmer l'existence d'un croisement entre deux espèces de coccinelles: *Coccinella*

septempunctata et *H. axyridis*. Dans le cas du collembole *Monobella grassei*, la technique du CAPS appliquée à la sous-unité II de la cytochrome oxydase a révélé l'absence de polymorphisme au sein des deux sous-espèces *M.g. banyulensis* et *M.g. distincta* en raison d'une variabilité intra-spécifique de ce gène trop faible.

D'autres techniques mieux adaptées à la comparaison d'individus taxonomiquement proches pourraient être essayées. Il pourra s'agir dans un premier temps d'analyser la variabilité de marqueurs protéiques (allozymes et isozymes) des individus de chacune des zones. Si le polymorphisme protéique s'avère trop faible, il sera nécessaire de faire appel à des techniques de biologie moléculaire comme par exemple le séquençage des régions variables du génome de l'insecte. Il pourrait s'agir d'une portion d'ADN nucléaire codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique ou d'un intron d'un gène codant pour une protéine. L'analyse de la variabilité d'une bande amplifiée par RAPD-PCR présente dans tous les échantillons serait aussi une solution pour essayer de mieux caractériser les individus trouvés dans les zones de contact. L'utilisation des marqueurs microsatellites, bien adaptés à l'étude des relations entre espèces très proches ou entre populations d'une même espèce, est aussi à envisager, à condition de les avoir au préalable caractérisés.

DEUXIEME PARTIE :

RESISTANCE AUX INSECTICIDES PAR
MODIFICATION DE
L'ACETYLCHOLINESTERASE

DEUXIEME PARTIE : RESISTANCE AUX INSECTICIDES PAR MODIFICATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

INTRODUCTION

En agriculture comme dans le domaine de la santé publique, la lutte contre les insectes est principalement chimique. Mais l'utilisation intensive de ces produits considérés comme indispensables a conduit à la sélection de populations résistantes aux insecticides. Dans certains cas cette situation est considérée comme préoccupante. D'année en année, le nombre de cas de résistance ne cesse d'augmenter (Georghiou, 1992). De plus, cette situation oblige sans cesse à recourir à de nouveaux insecticides toujours plus coûteux.

Chez de nombreux insectes d'importance économique, la modification de l'acétylcholinestérase (AChE) est un mécanisme majeur de résistance aux insecticides organophosphorés et aux carbamates, produits encore largement utilisés en raison de leur faible coût et de leur large spectre d'activité.

D'un point de vue fondamental, les acétylcholinestérases sont un modèle biochimique. L'AChE de drosophile, l'une des premières à avoir été caractérisée, est un modèle d'étude du fonctionnement de cette enzyme chez les insectes. Certaines mutations de l'enzyme impliquées dans la résistance sont bien connues chez cet insecte. A ce jour, le gène n'a été cloné que chez cinq autres insectes. Les mutations impliquées dans la résistance par modification de l'AChE n'ont été mises en évidence que chez deux d'entre eux: la mouche domestique et le doryphore.

La compréhension des mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la résistance, peut aider à remédier à l'usage abusif des insecticides chimiques dont on sait déjà qu'il conduira inévitablement à de nouveaux échecs. La gestion de la résistance en sera améliorée. Des stratégies de prévention de la résistance pourront même être envisagées.

A. GENERALITES

1. LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES : SITUATION ET MECANISMES IMPLIQUES

Depuis des décennies, les programmes de protection phytosanitaire sont principalement basés sur l'emploi d'insecticides chimiques de diverses familles. Mais l'utilisation intensive de ces insecticides a entraîné l'apparition de nombreux cas de résistance chez les insectes et acariens phytophages. Plus de 500 cas ont été répertoriés (Georghiou, 1992).

La résistance aux insecticides, que l'Organisation Mondiale de la Santé définit comme correspondant au développement d'une capacité de tolérer des doses de toxiques qui seraient léthales pour la majorité des individus d'une population normale de la même espèce, fait l'objet de préoccupations importantes car son impact dans l'agriculture peut s'avérer dramatique. C'est le cas par exemple, aux Etats-Unis, de la généralisation d'une souche résistante de *Bemisia tabaci* dont les dégâts sur de nombreuses plantes cultivées se chiffrent en millions de dollars.

Des stratégies de gestion de la résistance se développent dans de nombreux pays dans l'espoir d'enrayer l'extension du problème. On peut citer l'alternance de l'utilisation d'insecticides de familles différentes, les stratégies de la "fenêtre" en Australie (Forrester *et al.*, 1993) ou bien la lutte biologique.

Mécanismes de résistance:

Trois mécanismes peuvent intervenir dans la résistance (Soderlund et Bloomquist, 1990; Symondson et Hemingway, 1997) :

- réduction de la pénétration dans l'insecte de l'insecticide
- détoxification par augmentation de la métabolisation de l'insecticide
- modification de la cible des insecticides

La réduction de la pénétration de l'insecticide, résultat d'une modification dans la structure de la cuticule de l'insecte (Vinson et Law, 1971), n'occasionne que de faibles niveaux de résistance (Poirié et Pasteur, 1991) et ce n'est qu'associée à d'autres mécanismes qu'elle peut devenir préoccupante.

Les deux mécanismes suivants sont très largement responsables des niveaux de résistance les plus élevés.

La détoxification est le résultat de l'action de certaines enzymes telles que des estérases (Devonshire et Moores, 1982; Delorme *et al.*, 1988; Newcomb *et al.* 1996), des oxydases (MFO pour Multi Function Oxydases) comme les monooxygénases à cytochrome P450 (Pinchard, 1993 ; Tomita *et al.*, 1995; Bergé *et al.*, 1998) et les glutathione-S-transférases (GST) (Fournier *et al.*, 1992a et 1992b). D'un point de vue moléculaire, l'augmentation globale de l'activité de ces enzymes est la conséquence:

de modifications quantitatives de l'enzyme: surtranscription d'un ou de plusieurs gènes; surexpression liée à l'amplification génique par duplication multiple d'un même gène comme dans le cas des moustiques du genre *Culex* (Mouches *et al.*, 1990 et 1992, Guillemaud *et al.*, 1997a et 1997b)

de modifications qualitatives de l'enzyme: mutations ponctuelles sur le gène comme dans le cas de la mouche *Lucilia cuprina*: une mutation d'un acide aminé d'une carboxylestérase modifie considérablement son activité (Newcomb *et al.*, 1997)

Les cibles modifiées peuvent être:

- le canal sodium dépendant du voltage (gène *kdr* pour knock-down resistant) dans le cas d'une résistance aux pyréthrinoïdes et au D.D.T. (Scott et Dong, 1994),

- l'acétylcholinestérase (gène *Ace*) dans le cas des organo-phosphorés (O.P.) et des carbamates (Fournier et Mutero, 1994, Bocquené *et al.*, 1997),

- le récepteur de GABA (γ -aminobutyric acid) (gène *rdl* pour resistance to diedrin) dans le cas des cyclodiènes (Ffrench-Constant *et al.*, 1998),

- les récepteurs membranaires présents sur les cellules épithéliales du mésentéron dans le cas des endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (Ferré *et al.*, 1991).

Ces modifications sont le résultat de mutations ponctuelles au niveau du gène (Fournier *et al.*, 1992c; Shotkoski *et al.*, 1994; Feyereisen, 1995; ffrench-Constant *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, peu de mutations impliquées dans la résistance ont été trouvées: une pour le gène *rdl* (ffrench-Constant *et al.*, 1993), deux pour le gène *kdr* (Park *et al.*, 1997; Dong, 1997) et huit pour le gène *Ace* (Fournier *et al.*, 1992c; Mutero *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996b; Devonshire *et al.*, 1998).

Combinaisons de mécanismes de résistance:

Plusieurs mécanismes de résistance peuvent être associés chez un même individu (Cahill *et al.*, 1995). Par exemple, le puceron *Nasonovia ribisnigri* est résistant au pyrimicarbe et au propoxur (carbamates) par modification de l'acétylcholinestérase. Cet insecte est aussi résistant à l'endosulfan (organo-chloré) et dans une moindre mesure à la dieldrine (organo-chlorés) par détoxification par des glutathione-S-transférases (Rufingier *et al.*, 1999).

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance à un même insecticide: par exemple chez certaines souches de l'aleurode *Bemisia tabaci* (Dittrich *et al.*, 1990) et du psylle *Cacopsylla pyri* (Berrada *et al.*, 1994), la résistance au monocrotophos (O.P.) est le résultat de l'action de détoxification par des MFO et des estérases ainsi que de l'insensibilité de l'acétylcholinestérase.

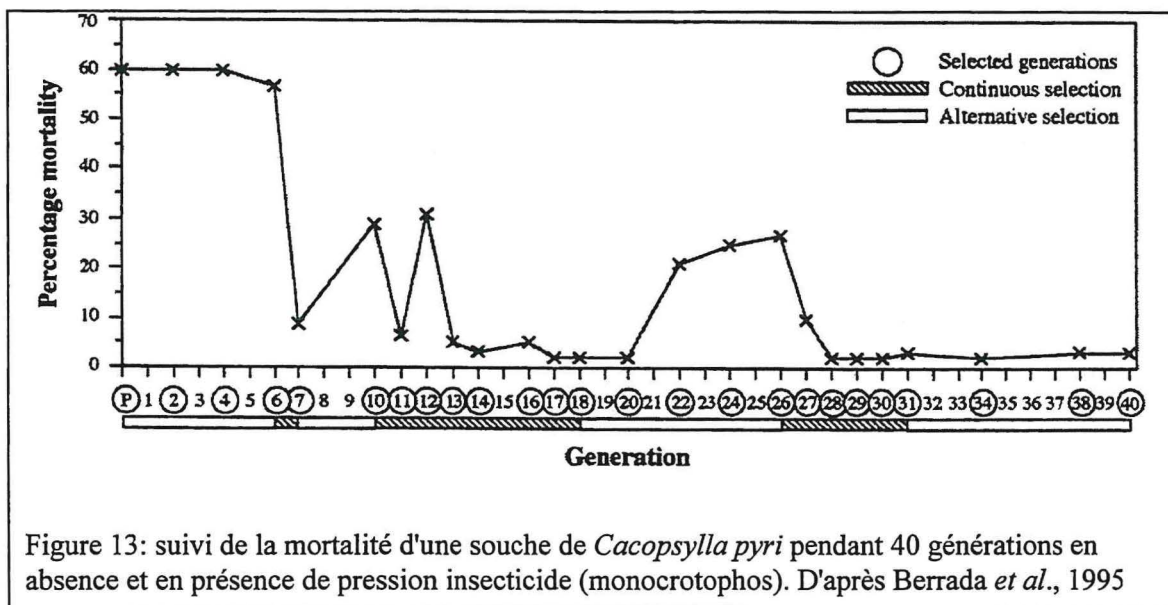
Dispersion des gènes de résistance:

L'avantage que procure les gènes de résistance aux insecticides est bien établi et dès leur apparition ces gènes peuvent se répandre assez rapidement par migration dans les régions traitées par les insecticides comme dans le cas des gènes amplifiés codant pour l'estérase B2 chez *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1991). Toutefois, l'apparition d'une résistance dans une population donnée peut aussi correspondre à la sélection de façon indépendante de la même mutation et non pas nécessairement à une migration. Le fait de trouver la même mutation dans des espèces différentes est la preuve que la mutation est le résultat d'évènements indépendants (Thompson *et al.*, 1993).

Evolution de la résistance:

L'évolution de la résistance peut varier différemment selon le mécanisme impliqué. Dans le cas de l'amplification génique, il semblerait que le nombre de copies du gène amplifié puisse aisément fluctuer d'une génération à l'autre et il est donc très probable que le niveau de résistance puisse varier rapidement en réponse à des changements d'intensité du traitement insecticide (Guillemaud et Raymond, 1997). Une perte de la résistance peut même apparaître conséquence d'une sous-transcription par hypométhylation de l'ADN du gène amplifié (Field, 1989).

Berrada *et al.* (1995) ont suivi en laboratoire l'évolution d'une souche du psylle du poirier *Cacopsylla pyri* pendant 40 générations en exerçant une pression de sélection avec du monocrotophos (organo-phosphoré). La pression de sélection a été effectuée soit sur plusieurs générations successives soit ponctuellement sur certaines générations. L'évolution de la mortalité (figure 13) fait apparaître que la résistance au monocrotophos apparaît à la septième génération et que le niveau de résistance ne se maintient pas si la pression insecticide n'est pas continue (générations 21 à 26). A partir de la 31^{ème} génération, la résistance se stabilise à un niveau élevé même lorsque la pression insecticide est discontinuée. Les mutations associées à la résistance en début de sélection auraient un coût élevé alors que celles sélectionnées après 30 générations sur les individus homozygotes résistants n'auraient pas de coût associé. Le coût correspond à l'effet négatif qu'un gène de résistance exerce sur la valeur sélective en absence d'insecticides (Roush et Daly, 1990).



Un autre exemple de stabilité de la résistance pendant une longue période sans forte pression insecticide est celui du moustique *Culex quinquefasciatus* à Cuba (Rodriguez *et al.*, 1993). Par contre, en Italie la fréquence des gènes de résistance décroît chez cet insecte après chaque campagne de traitement insecticide; elle ne décroît qu'au bout de 6 années sans applications chez le moustique *Anopheles sacharosi* en Turquie (Bonning *et al.*, 1991 et Hemingway *et al.*, 1992).

Détection des mécanismes de résistance:

Les mécanismes de résistance peuvent être mis en évidence de différentes façons, après que le niveau global de résistance ait été mesuré *in vivo* par des "bioessais" (applications topiques d'insecticides, trempage de l'insecte ou d'un support pour l'insecte dans des solutions insecticides ou incorporation de l'insecticide dans un milieu nutritif).

Symondson et Hemingway (1997) ont passé en revue les principales techniques biochimiques et moléculaires de détection de la résistance. Citons par exemple :

- l'utilisation de produits (synergistes) tels que le DEF (S,S,S, tributyl phosphorotrithioate) qui inhibe les estérases, le TPP (triphenyl phosphate) qui inhibe les carboxylestérases et le pipéronyl butoxide qui inhibe les monooxygénases

- des cinétiques enzymatiques en présence de substrats spécifiques de l'enzyme (acétylthiocholine dans le cas de l'acétylcholinestérase, 4-méthyl-umbelliferyl acétate et α naphthyl acétate dans le cas d'estérase non spécifiques, ethoxycoumarine dans le cas des oxydases, chlorodinitrobenzène (CDNB) dans le cas des GST) .
- des réactions d'amplification PCR en présence d'amorces spécifiques de la mutation impliquée dans la résistance (technique du PASA: PCR Amplification of Specific Alleles) (Sarkar *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 1992).

2. L'ACETYLCHOLINESTERASE

2.1. STRUCTURE ET FONCTION

Cette enzyme appartient à la famille des cholinestérase, enzymes largement distribuées dans le règne animal et qui catalysent préférentiellement les réactions d'hydrolyse des esters de choline.

Ces cholinestérase, qui sont des hydrolases à sérine, sont divisées en deux groupes selon le type de substrat hydrolysé : les butyrylcholinestérase (BuChE) qui hydrolysent les esters butyrique, propionique et succinique de la choline et les acétylcholinestérase (AChE) qui hydrolysent l'ester acétique de la choline. Il faut noter que la butyrylcholine n'est pas un substrat naturel des vertébrés.

Un des critères qui différencie les cholinestérase des autres estérase (ali- et arylestérase) est la sensibilité des cholinestérase à un carbamate : l'ésérine (appelée aussi physostigmine) à 10^{-5} M.

Des critères cinétiques, dont la vitesse d'hydrolyse vis à vis des divers esters de choline, l'inhibition spécifique de l'AChE par le BW 284C51 (bis (4-allyldiméthylammoniumphényl)pentan-3-one bromide) et l'inhibition de la BuChE par l'iso-OMPA (tétramonoisopropylpyrophosphor-tétramide) (Bocquené, 1996) permettent de différencier les AChEs des BuChEs.

Selon ces critères, les butyrylcholinestérases, à ce jour, n'ont été mises en évidence que chez les vertébrés. Cette enzyme n'est pas indispensable puisque par exemple certaines personnes en sont dépourvues. Elle est inhibée par les insecticides organo-phosphorés.

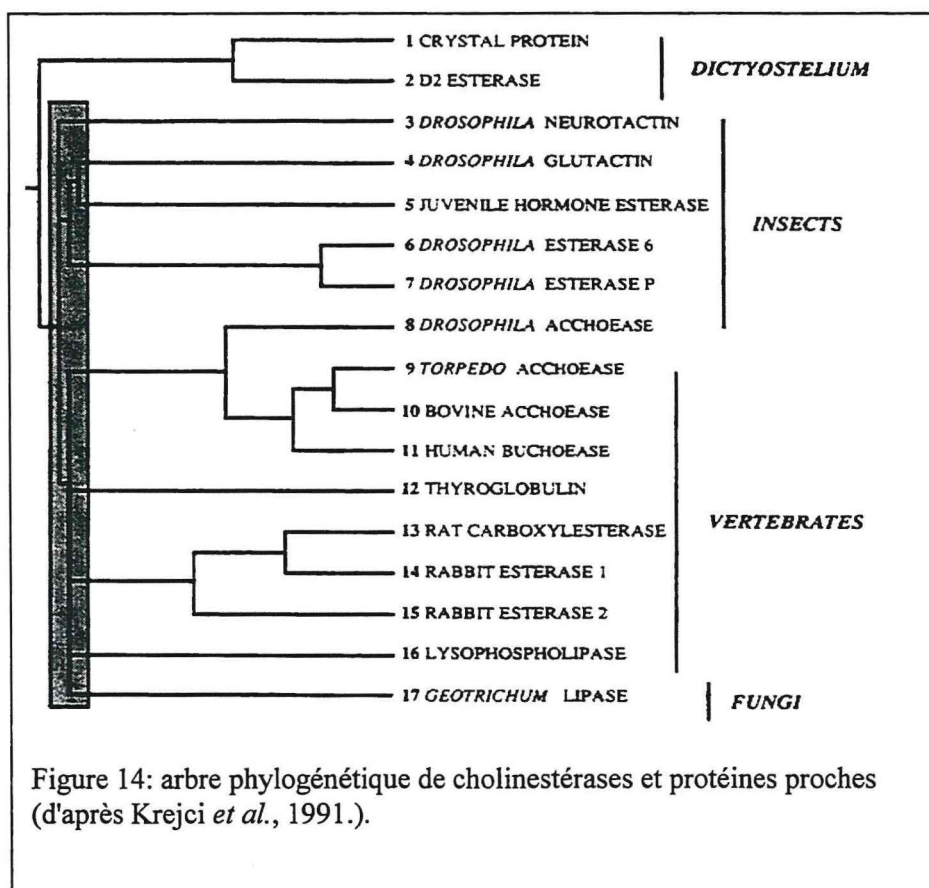
Chez les invertébrés, les acétylcholinestérases peuvent à la fois hydrolyser l'ester acétique et l'ester butyrique de la choline, ce qui remet quelque peu en question la différenciation des deux groupes de cholinestérases chez les invertébrés si l'on se réfère aux critères de différenciation chez les vertébrés.

Des protéines présentent des homologues avec les cholinestérases (Krejci *et al.*, 1991):

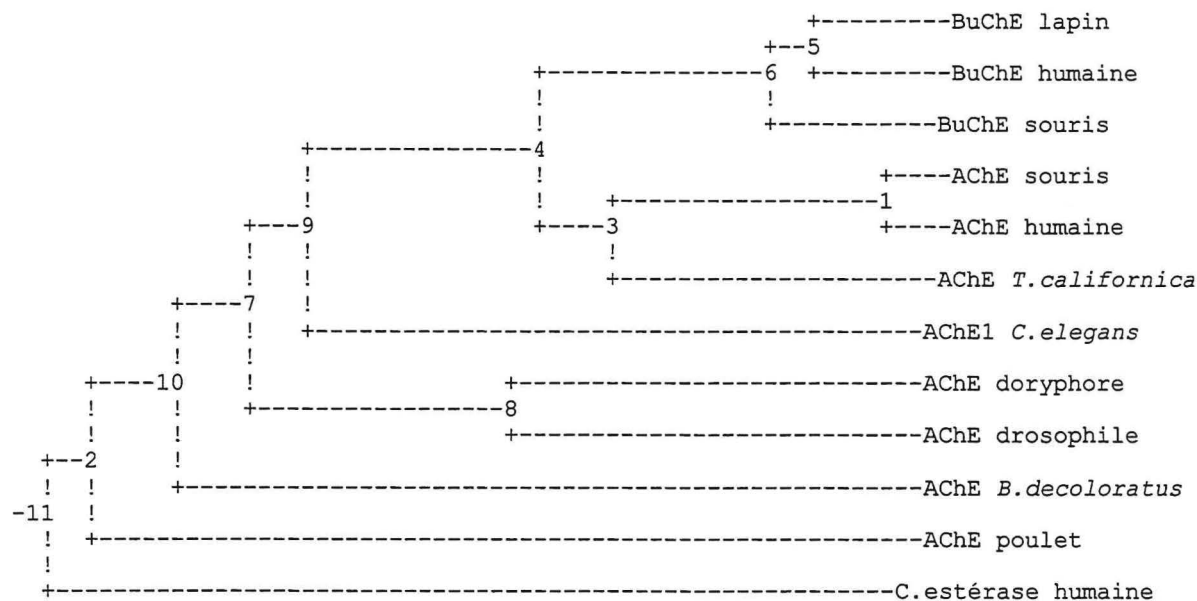
- # d'autres hydrolases à sérine comme des carboxylestérases, des lysophospholipases pancréatiques, des estérases et des lipases

- # des protéines non catalytiques: des thyroglobulines et deux protéines qui semblent impliquées dans les interactions cellulaires chez la drosophile: la glutactine et la neurotactine.

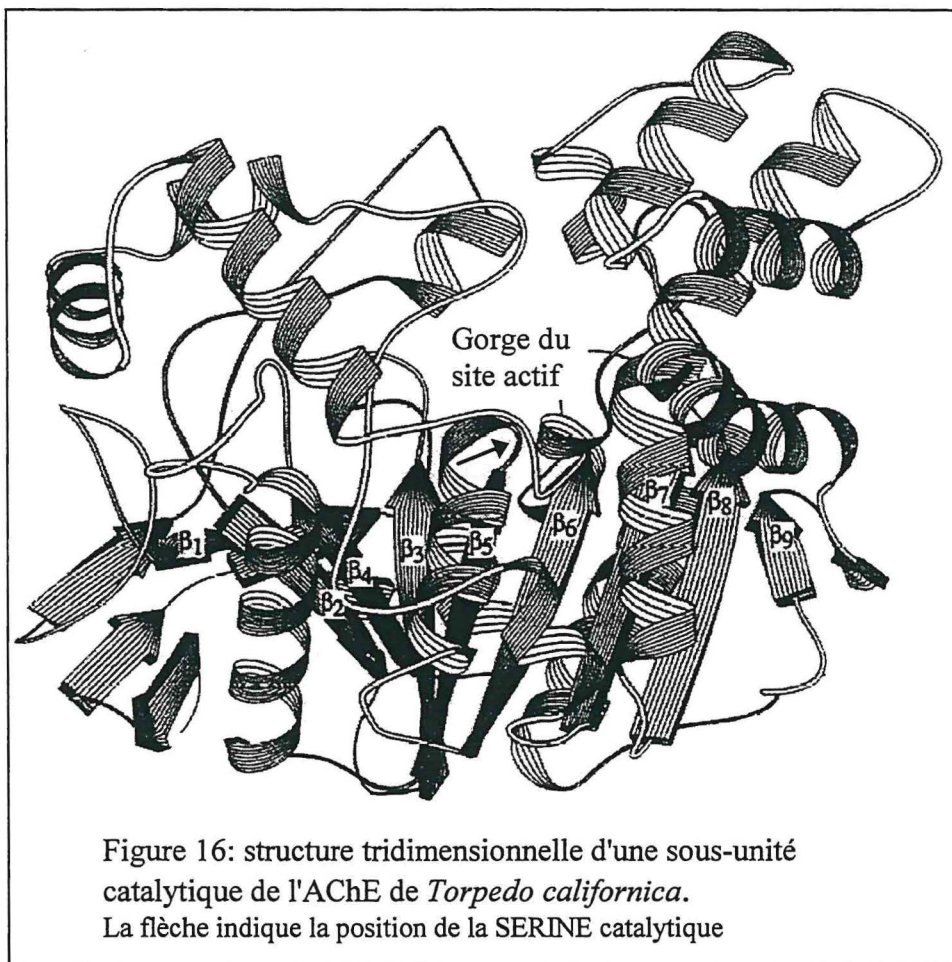
L'arbre phylogénétique (figure 14) construit à partir de la séquence peptidique des enzymes permettent de visualiser les liens existant entre ces différentes protéines qui forment ainsi un groupe assez homogène indépendamment des groupes zoologiques (la divergence entre les vertébrés et les invertébrés est estimée à 700 millions d'années, de même pour la divergence entre les poissons tels que ceux du genre *Torpedo* et les mammifères). Les relations existant entre les enzymes catalytiques et non catalytiques suggèrent que la fonction catalytique a pu être perdue au cours de l'évolution de façon indépendante à différentes occasions (Krejci *et al.*, 1991).



Les cholinestérases (AChE et BuChE) constituent une famille de protéines homogènes chez les vertébrés et chez les invertébrés comme l'indique la figure 15.

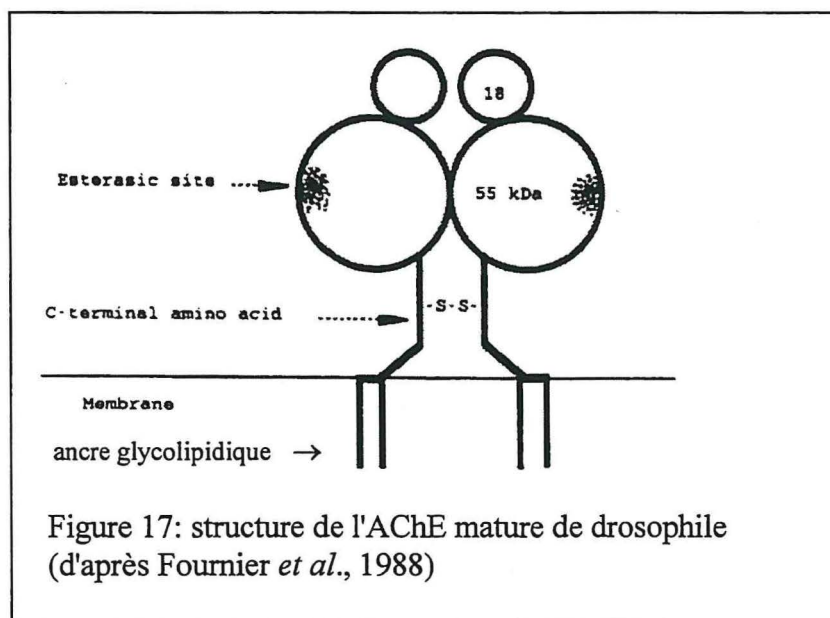


Chez les vertébrés, l'AChE peut présenter diverses formes, conséquence d'un épissage alternatif combiné à des modifications post-traductionnelles. La sous-unité contenant le site actif de l'enzyme est constituée de feuillets β et d'hélices α (figure 16). Le site actif de l'enzyme est situé au fond d'une gorge d'environ 20 Å de profondeur (Sussman *et al.*, 1991).



Chez les insectes (drosophile et mouche domestique), la forme majoritaire de l'AChE est un dimère amphiphile (Fournier *et al.*, 1988). Chaque monomère comprend deux sous-unités reliées entre elles par des liaisons faibles: une sous-unité de 18 kDa et une sous-unité de 55 kDa qui porte d'une part une ancre glycolipidique assurant la fixation de l'enzyme sur la membrane cellulaire et d'autre part le site actif de l'enzyme. Les 2 monomères sont reliés entre eux de manière covalente par un pont disulfure (figure 17). Le monomère précurseur de 70kDa subit des modifications post-traductionnelles dont un clivage au niveau d'un

peptide hydrophile pour donner les deux sous-unités imbriquées l'une dans l'autre. Il y a création de trois ponts disulfure intra-chaîne ainsi que le remplacement du peptide hydrophobe en position C-terminale par un glycolipide (glycosyl phosphatidyl inositol) qui assure l'ancrage à la membrane.



Fonction de l'AChE:

L'AChE joue, chez les êtres vivants, un rôle fondamental dans la transmission de l'influx nerveux en hydrolysant l'acétylcholine au niveau des jonctions inter-neuronales (synapses). Chez les vertébrés, l'hydrolyse de l'acétylcholine se fait aussi au niveau des jonctions neuro-musculaires. La BuChE n'est pas impliquée dans la transmission de l'influx nerveux. Cette enzyme aurait un rôle dans la détoxification de certains composés naturels (Massoulié *et al.*, 1993).

A l'arrivée de l'influx nerveux, la terminaison pré-synaptique libère une importante quantité du neurotransmetteur, l'acétylcholine, qui se fixe sur les récepteurs nicotiques (les canaux ioniques Na/K). L'activation de ces récepteurs entraîne une dépolarisation de la membrane post-synaptique et c'est l'élimination du neurotransmetteur par l'enzyme qui permet la repolarisation de la membrane (figure 18).

Le processus de transmission de l'influx nerveux est extrêmement rapide, de l'ordre de la milliseconde quant à la modification de la perméabilité de la membrane. La synapse est capable de transmettre jusqu'à un millier d'impulsions par seconde à condition que l'acétylcholine soit très rapidement détruite après son action. L'AChE de drosophile est capable d'hydrolyser jusqu'à 2500 molécules d'acétylcholine par seconde ce qui confère à l'AChE d'être l'enzyme qui possède une vitesse de réaction parmi les plus rapides que l'on connaisse.

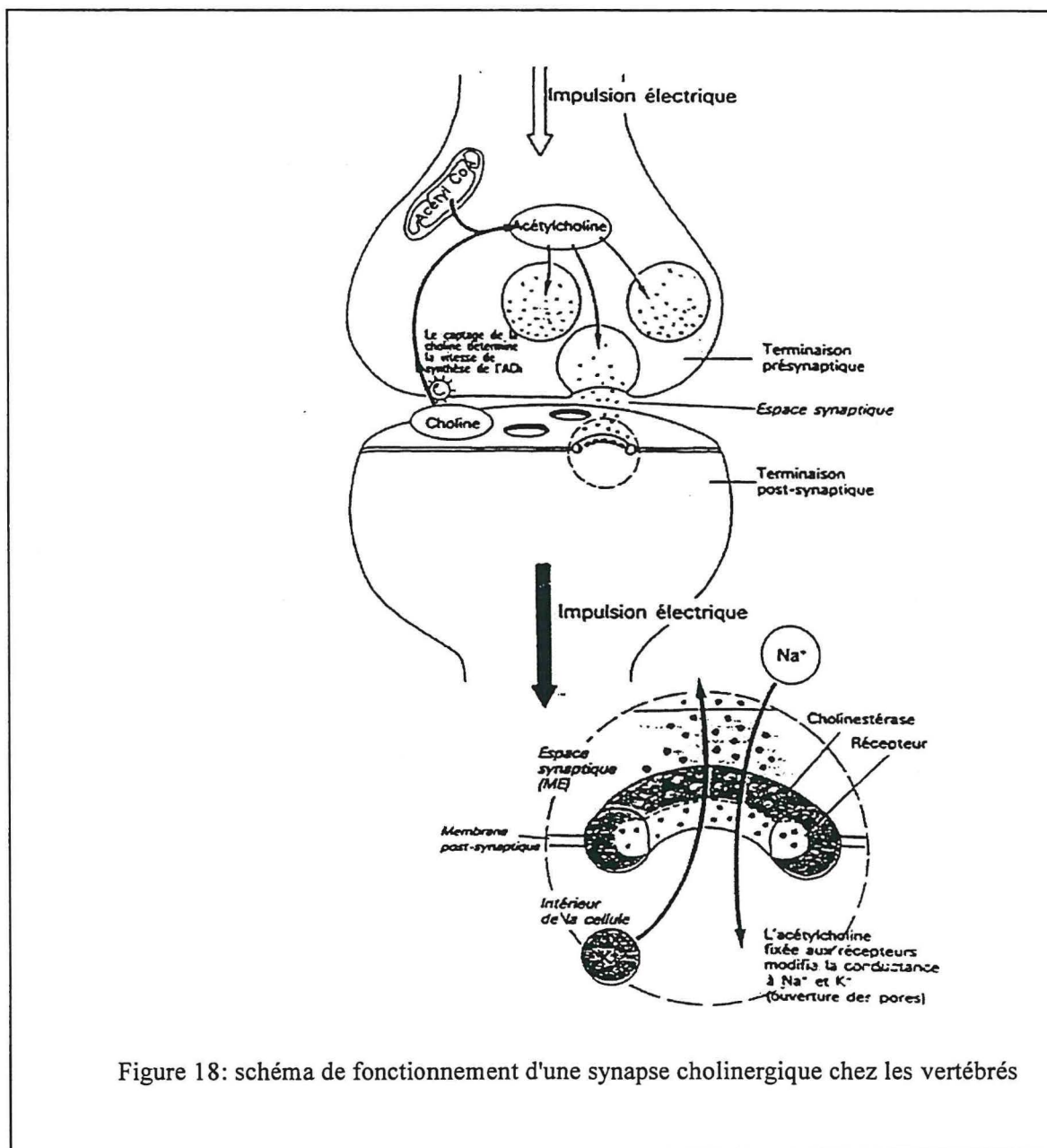
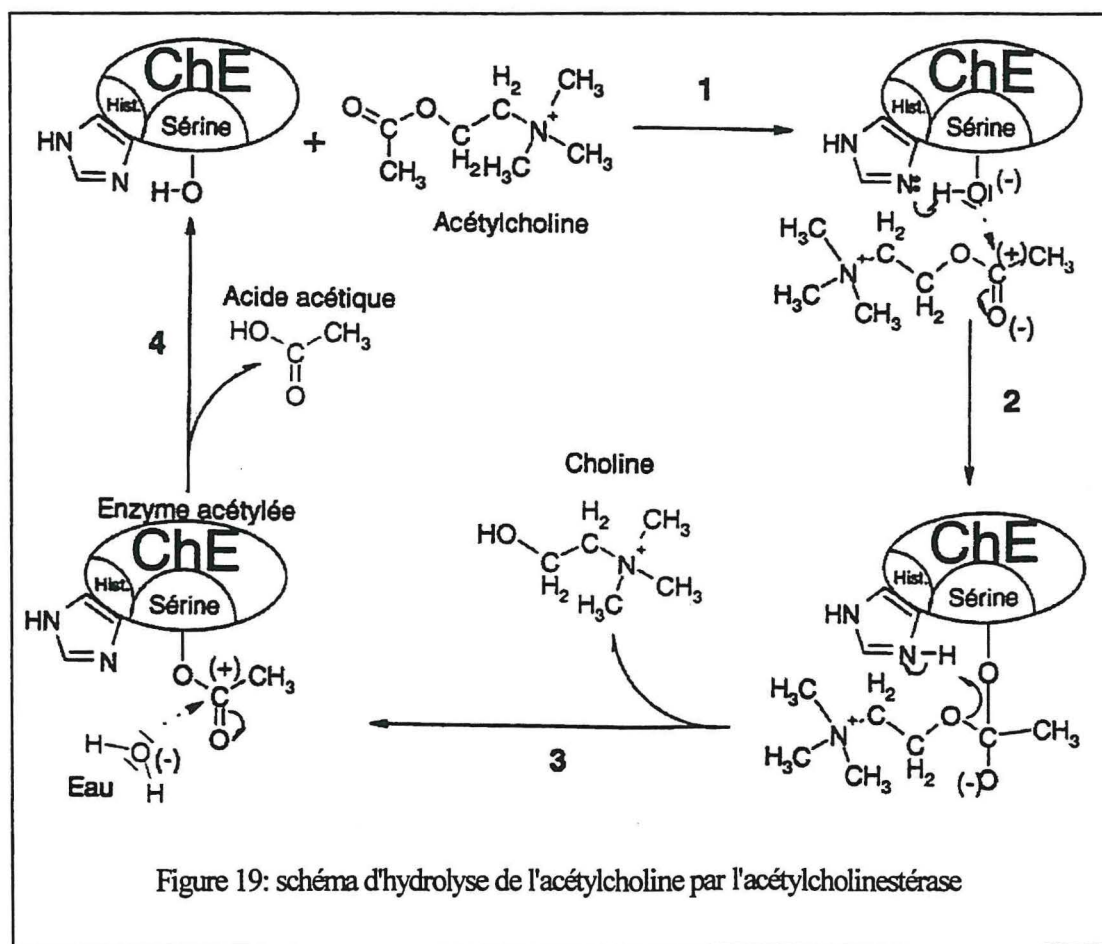


Figure 18: schéma de fonctionnement d'une synapse cholinergique chez les vertébrés

L'AChE hydrolyse l'acétylcholine en deux étapes principales: libération de la choline en même temps qu'une acétylation de l'enzyme puis déacétylation de l'enzyme qui est ainsi régénérée avec libération d'acide acétique (figure 19). La choline est récupérée au niveau de la membrane pré-synaptique afin que la choline-acétyl-transférase (ChAT) puisse resynthétiser de l'acétylcholine.



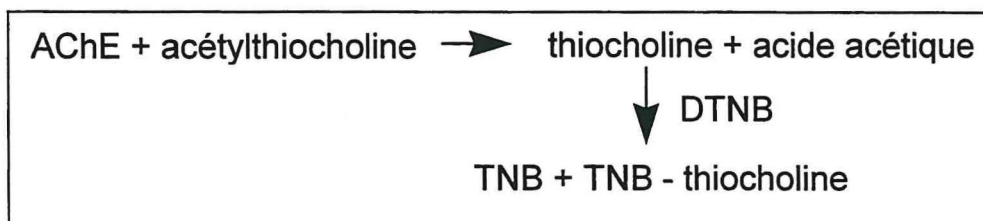
Plusieurs auteurs ont suggéré que les AChE pouvaient être impliquées dans des fonctions non cholinergiques. Cette enzyme jouerait notamment un rôle de modulation de l'activité de certains neurones chez certains vertébrés comme le poulet (Appleyard, 1994). Elle pourrait avoir un rôle morphogénétique pour des stades embryonnaires précoces chez le poulet (Drews et Mengis, 1990) ainsi qu'un rôle dans le contrôle de la croissance des

neurites et dans les mécanismes de reconnaissance et d'adhérence cellulaire (Massoulié *et al.*, 1993 ; Massoulié et Bon, 1993).

Chez les invertébrés, l'AChE n'a été localisée que dans le système nerveux central, la transmission neuro-musculaire n'étant pas de type cholinergique.

Mesure de l'activité de l'AChE:

La méthode spectrophotométrique d'Ellman *et al.* (1961) permet de doser l'activité de l'AChE. Cette méthode utilise le DTNB (acide dithio-bis-nitrobenzoïque) qui réagit avec les groupements thiols de la thiocholine libérée au cours de la réaction enzymatique en présence d'acétylthiocholine. Il se forme du TNB (acide thionitrobenzoïque) de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont l'intensité de la coloration est fonction de l'activité de l'enzyme.



2.2. CARACTERISATION DU GENE CODANT POUR L'ENZYME

Stratégies de clonage du gène:

Diverses stratégies ont été utilisées pour le clonage du gène codant pour les cholinestérases (AChE et BuChE):

- microséquençage de la protéine:

Des sondes nucléotidiques déduites de séquences de peptides d'AChE ont été utilisées pour cribler des banques. Le gène codant pour l'AChE du poisson torpille *Torpedo californica* a été cloné ainsi (Schumacher *et al.*, 1986). Lorsque il y avait une grande disponibilité en protéine et d'autre part grâce aux progrès dans les techniques de purification

des protéines (principalement des chromatographies d'affinité), la séquence complète de l'enzyme a pu être obtenue sans clonage préalable du gène. C'est par exemple le cas de l'AChE bovine (Doctor *et al.*, 1990) et celui de la BuChE humaine (Lockridge *et al.*, 1987).

- criblage immunologique:

Sikorav *et al.* (1985, 1987) ont cloné le gène codant pour l'AChE chez une espèce voisine de *T. californica* (*T. marmorata*) après un criblage immunologique à l'aide d'anticorps de lapin anti-acétylcholinestérase de *T. marmorata*.

- marche sur le chromosome:

Chez la drosophile, le gène codant pour l'AChE a été localisé génétiquement sur le chromosome 3 (Hall et Kankel, 1976). Bender *et al.* (1983) ont effectué une marche sur le chromosome ce qui a permis de cartographier le gène. Les clones dans lesquels un fragment du gène avait été repéré ont été utilisés pour cribler une banque d'ADNc. Un clone positif de cette banque d'ADNc a été marqué et utilisé pour cribler une banque d'ADN génomique ce qui a permis de déterminer la séquence (Hall et Spierer, 1986; Fournier *et al.*, 1989).

- sondes nucléotidiques définies dans les "boîtes conservées" ou provenant de clones:

L'alignement des séquences peptidiques d'AChE ou de BuChE connues fait apparaître des zones conservées entre différentes espèces. A partir de ces "boîtes conservées" sont déduits des oligonucléotides qui sont utilisés comme sondes. Ces sondes, une fois marquées, sont utilisées directement pour cribler des banques d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire. Le gène de l'AChE humaine a été cloné par criblage de banques d'ADN génomique humain avec des sondes nucléotidiques de l'AChE du poisson torpille (Soreq *et al.*, 1990). La structure du gène de la BuChE humaine a été identifiée après criblage de banques d'ADN génomique de globules blancs avec des clones positifs de cDNA (Arpagaus *et al.*, 1990). Ces clones de cDNA ont été identifiés par hybridation par une sonde marquée

dont la séquence nucléotidique est déduite de la séquence peptidique de la BuChE séquencée en 1987 par Lockridge *et al.* (McTiernan *et al.*, 1987).

Dans le cas du moustique *Anopheles stephensi*, le gène a été cloné par criblage d'une banque d'ADN génomique avec comme sonde un clone d'ADNc codant pour l'AChE de drosophile (Malcolm et Hall., 1990).

Avec le développement de la technique PCR depuis 1990, les sondes utilisées pour cribler des banques d'ADN génomique ou d'ADNc, sont des fragments amplifiés par PCR du gène à l'aide de couples d'amorces définies sur les "boîtes conservées", (Gould *et al.*, 1989). Chez les vertébrés, ont été clonés selon cette stratégie le gène de l'AChE chez la souris (Rachinski *et al.*, 1990), le lapin (Jbilo *et al.*, 1994) et plus récemment la myxine *Myxine glutinosa* (séquence partielle) (Sanders *et al.*, 1996), les amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* (séquence partielle) et *B. floridae* (Sutherland *et al.*, 1997; McClellan *et al.*, 1998) ainsi que le calmar *Loligo opalescens* (Talesa *et al.*, 1999).

Chez les invertébrés, il s'agit des nématodes *Caenorhabditis elegans* (Arpagaus *et al.*, 1998), *C. briggsae* (Grauso *et al.*, 1996; 1998) et *Meloidogyne incognita* et *M. javanica* (Piotte *et al.*, 1999).

Chez les acariens, il s'agit de *Boophilus microplus* (Baxter *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 1999), *Boophilus decoloratus* (Baxter et Barker, 1999) et *Rhipicephalus appendiculatus* (Baxter et Barker, 1999).

Chez les insectes, le gène a été cloné chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu et Clark, 1995), la mouche domestique *Musca domestica* (Williamson *et al.*, 1992; Devonshire *et al.*, 1998) et le moustique *Aedes aegypti* (Anthony *et al.*, 1995) par criblage de banque d'ADNc à l'aide de sondes PCR dont les amorces ont été définies dans les "boîtes conservées" (tableau 1). Une séquence codant pour l'AChE de la mouche *Lucilia cuprina* est disponible dans les banques (séquence soumise par Chen en 1997).

Tableau 1: liste des "boîtes conservées" ayant servi à l'élaboration des amorces PCR en vue du clonage du ou des gènes codant pour les AChE d'invertébrés

ESPECE	BOITE CONSERVEE	POSITION DROSOPHILE
<i>Caenorhabditis elegans</i>	EDCLYLN	129 -135
<i>C. briggsae</i>	FGESAG	273 -278
<i>Meloidogyne incognita</i>	GSEMWN	117 - 122
<i>M. javanica</i> (nématodes)	GTEMWN	117 - 122
<i>Boophilus microplus</i> (acarion)	EDCLYLN	129 -135
	WIYGGG	184 - 189
	FGESAG	273 - 278
<i>Aedes aegypti</i> (insecte)	YDFIDY	412 - 417
	WGEWM	510 - 514
<i>Musca domestica</i> (insecte)	EWMGVLHG	512-519
	FWNDYLP	600-606
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (insecte)	WIYGGG	184 - 189
	VGAFGF	220 - 225
	FGESAG	273 - 278

Organisation du gène:

Chez les vertébrés: l'organisation des gènes codant pour l'AChE (ou la BuChE) est connue chez de nombreuses espèces. La taille de la région transcrite du gène varie considérablement d'une espèce à l'autre principalement selon la taille et le nombre des introns: celle de l'AChE de *T. californica* est de 25 kb et comprend 6 exons dont 4 sont codants (Maulet *et al.*, 1990). Chez les mammifères (homme et souris), la taille varie de 4,5 à 4,7 kb. (Li *et al.*, 1991).

Chez les invertébrés, de nombreux travaux ont porté sur le nématode *Caenorhabditis elegans* chez qui quatre gènes codant pour des AChE à propriétés catalytiques différentes ont été trouvés (Johnson *et al.*, 1988; Arpagaus *et al.*, 1994; Arpagaus *et al.*, 1998). Le gène *ace-1*, localisé sur le chromosome X, exprime l'AChE dans les tissus musculaires et le gène *ace-2*, localisé sur le chromosome I, assure l'expression de l'AChE dans les tissus nerveux. Le gène *ace-1* comprend 8 introns (3,3 kb au total) et la taille de la partie codante est de 1860 pb

(Arpagaus *et al.*, 1994). Les gènes *ace-x* et *ace-y* sont localisés sur le chromosome II. Leur rôle est inconnu. Chez *C. briggsae*, comme chez *C. elegans*, quatre gènes ont été identifiés: *ace-1* a été complètement séquencé (Grauso *et al.*, 1996) et trois autres gènes ont été partiellement séquencés (Grauso *et al.*, 1998).

Chez les insectes, l'organisation du gène codant pour l'AChE n'est connue à ce jour que chez la drosophile *Drosophila melanogaster* et le moustique *Anopheles stephensi*. Chez la drosophile, des études génétiques ont montré qu'il n'existait qu'un seul gène codant pour l'AChE (Hall et Kankel, 1976; Greenspan *et al.*, 1980). Ce gène a été cloné et l'organisation déterminée (Hall et Spierer, 1986; Fournier *et al.*, 1989). Ce gène comporte 10 exons dont 9 sont codants (la taille de la partie codante est de 1950 pb) séparés par des introns de longueur variable et distribués sur 34 kb (figure 20 et tableau 2). Chez certaines souches, comme Canton-S ou *Ace*¹²⁶, des insertions de plusieurs kb ont été observées au niveau de certains introns (figure 20). L'expression *in vitro* a confirmé que ce gène codait bien pour une AChE (Fournier *et al.*, 1988, 1992d).

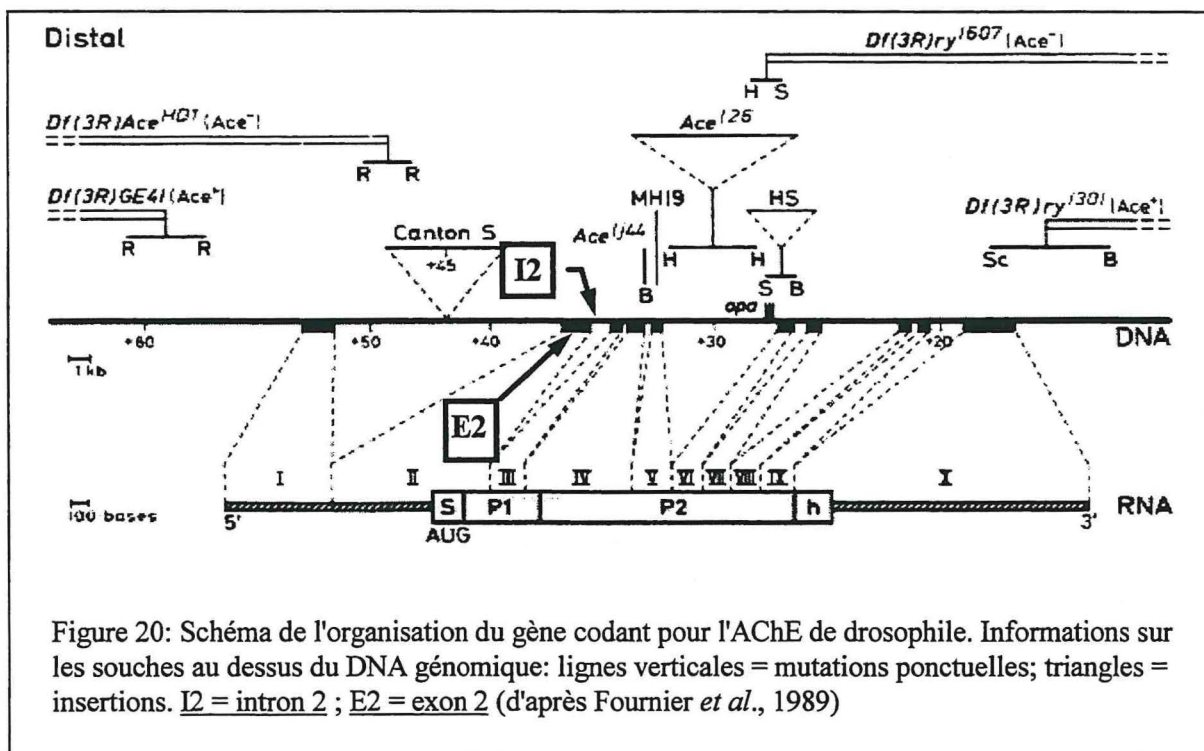


Figure 20: Schéma de l'organisation du gène codant pour l'AChE de drosophile. Informations sur les souches au dessus du DNA génomique: lignes verticales = mutations ponctuelles; triangles = insertions. I2 = intron 2 ; E2 = exon 2 (d'après Fournier *et al.*, 1989)

Chez *A. stephensi*, le gène comprend 10 exons (taille: 1992 pb) distribués dans seulement 3 Kb (Malcolm et Hall., 1990; Hall et Malcolm, 1991), les différents introns étant de taille réduite (tableau 2). Il faut remarquer la présence d'un intron surnuméraire (que j'ai appelé 3') par rapport à la drosophile. L'hybridation chromosomique réalisée par Malcolm et Hall (1990) avec le clone positif d'ADN génomique de ce moustique M2-42 (hybridation avec cDNA AChE de drosophile) a révélé la présence de deux loci sur deux chromosomes différents pouvant suggérer l'existence de deux gènes codant pour deux acétylcholinestérases.

La position des introns sur le gène est identique chez la drosophile et *A. stephensi*.

Tableau 2: taille moyenne des introns en pb chez la drosophile (*D. mel.*) et le moustique *A. stephensi* (*A. step.*).

	intron 2	intron 3	intron 3'	intron 4	intron 5	intron 6	intron 7	intron 8	intron 9
<i>D. mel.</i>	1200	140	-	150	4500	730	3000	115	2500
<i>A. step.</i>	62	46	67	70	80	74	73	88	97

Acides aminés caractéristiques des AChE:

Certains acides aminés sont impliqués dans les fonctions essentielles de l'AChE. Au niveau du site actif de l'enzyme situé au fond d'une gorge d'environ 20Å de profondeur (Sussman *et al.*, 1991), trois acides aminés forment la triade catalytique: la sérine S276 (200), (le premier nombre fait référence à la position de cet acide aminé dans la séquence de l'enzyme de la drosophile et celui entre parenthèse du poisson torpille), l'acide glutamique E405(327) et l'histidine H518(440). Ces trois résidus sont conservés et jouent un rôle majeur dans la réaction enzymatique.

La phénylalanine F368 (290) située dans la "poche acyle" au niveau de la paroi de la gorge joue un rôle important dans la spécificité de reconnaissance du substrat.

D'autres acides aminés aromatiques sont également conservés: les tryptophanes W121(84) et W359(279), situés sur le site périphérique à l'entrée de la gorge et dont le rôle serait de participer à la fixation du substrat puis sa projection au fond de la gorge.

Six cystéines: C104(67), C131(94), C330(254), C345(265), C480(402) et C598(521) sont également conservées quelle que soit l'espèce. Ces cystéines, engagées dans des ponts disulfure intra-chaînes, assurent la stabilité conformationnelle de la protéine.

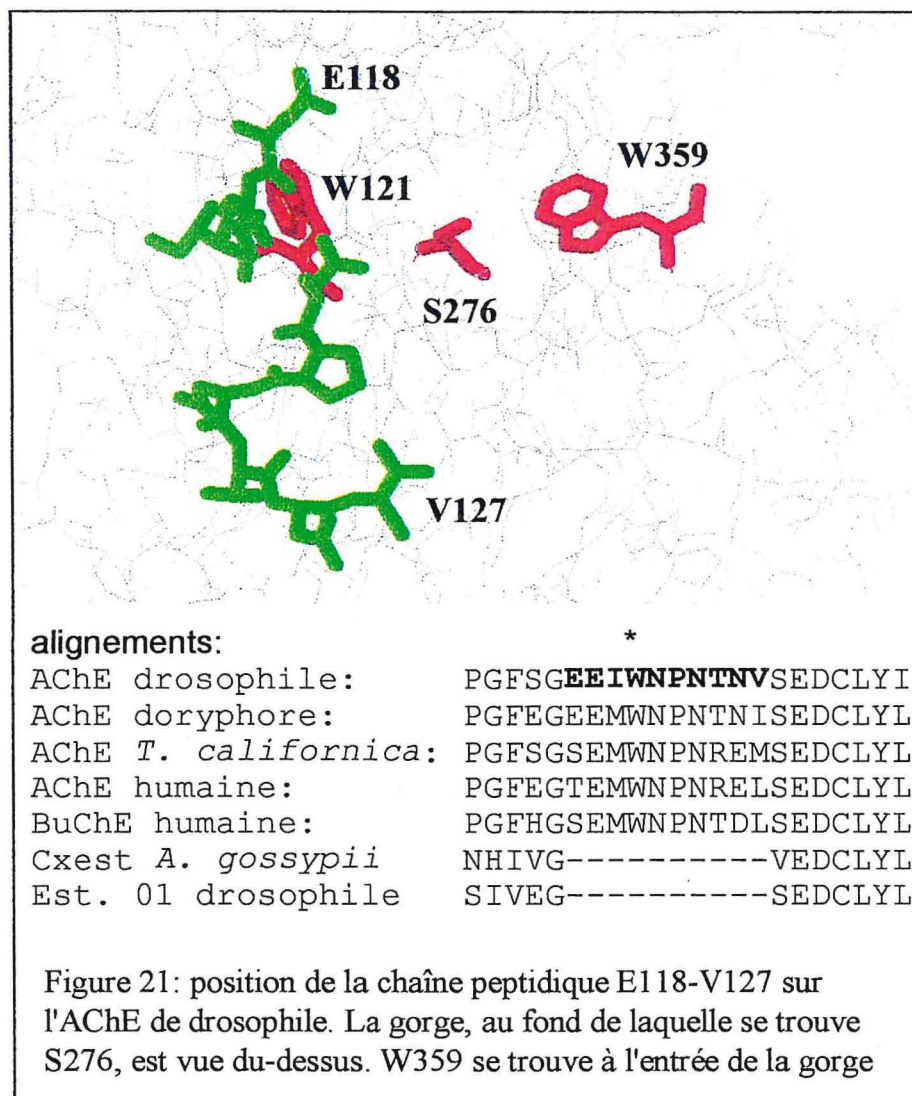
On retrouve certains de ces acides aminés dans d'autres hydrolases à sérine et dans les protéines proches non catalytiques. Comment alors distinguer les AChEs (et les BuChEs) de ces protéines ?

Les protéines non catalytiques (thyroglobulines, glutactine et neurotactine) se caractérisent par l'absence de la sérine catalytique S276 (200).

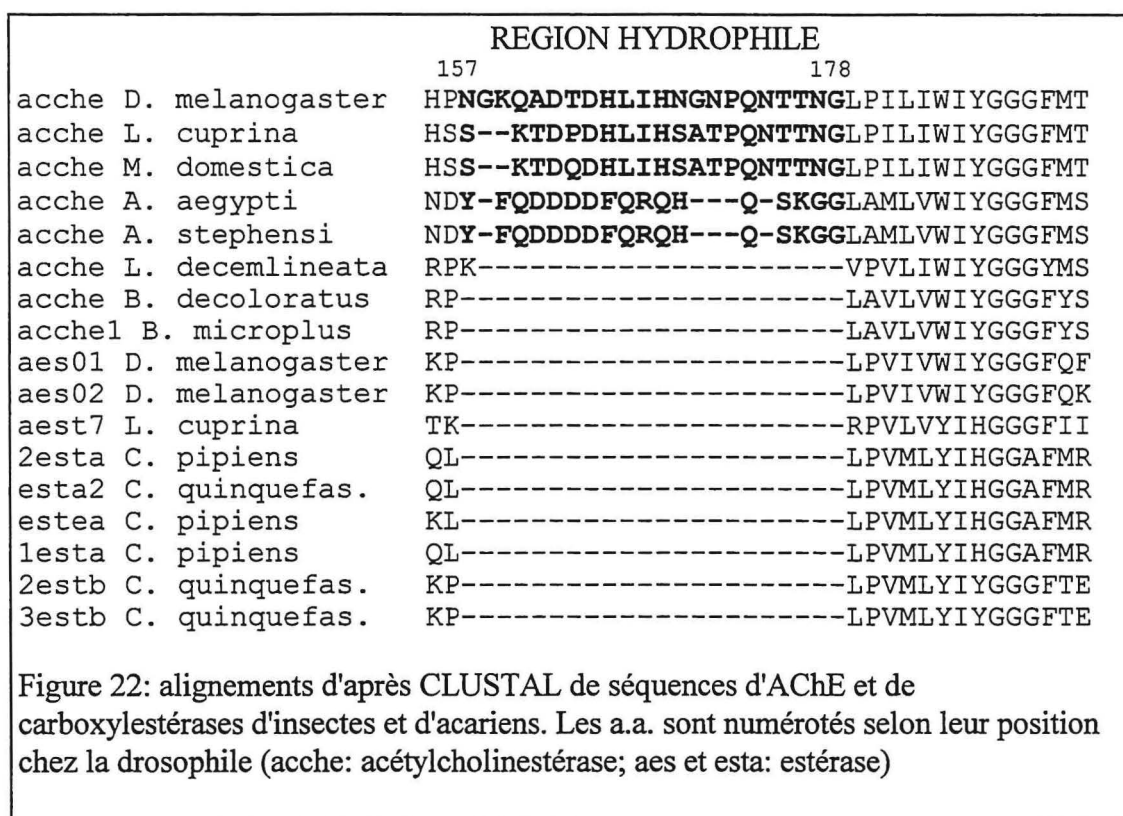
Les hydrolases à sérine ont toutes la triade catalytique ainsi que C104(67), C131(94) et C345(265) mais les AChEs et les BuChEs se caractérisent par:

- W121(84), C330(254), C480(402) et C598(521)
- une région de 10 acides aminés autour de W121 (118 à 127) (figure 21). Cette région est située à l'entrée de la gorge et c'est cette séquence peptidique, et non pas uniquement W121, qui doit participer à la reconnaissance du substrat de façon spécifique.

Les AChEs se distinguent des BuChes par F368(290) et W359(279) qui ne se trouvent que chez les AChEs.



Les AChEs des insectes de l'ordre des Diptères ont la particularité d'avoir une séquence peptidique supplémentaire d'une vingtaine d'acides aminés peu conservées d'une espèce à l'autre, comme l'indique la figure 22 ci-dessous. C'est une région hydrophile qui forme une boucle à l'extérieur de la protéine et qui ne serait donc pas impliquée dans l'hydrolyse du neurotransmetteur mais son rôle n'est pas connu.



2.3. MODE D'ACTION DES INSECTICIDES

Les insecticides organo-phosphorés et carbamates sont des substrats compétitifs de l'acétylcholine: leur structure moléculaire est analogue à celle de l'acétylcholine. Ils agissent en phosphorylant et en carbamylant la sérine du site actif mais la régénération de l'enzyme n'a pas lieu ou est très lente. La quantité d'enzyme fonctionnelle devient insuffisante pour assurer l'hydrolyse de l'acétylcholine. L'acétylcholine n'étant plus métabolisée, elle s'accumule dans la synapse et maintient les récepteurs nicotiniques (les canaux ioniques Na/K post-synaptiques) en

position ouverte. La repolarisation de la membrane post-synaptique n'a pas lieu, ce qui bloque toute transmission nerveuse et entraîne à terme la mort de l'organisme intoxiqué.

Selon le type d'insecticide, la réversibilité de l'inhibition peut être plus ou moins rapide (figure 23). L'inhibition est plus rapidement réversible dans le cas des carbamates (carbaryl) que dans le cas des organo-phosphorés (paraoxon). Avec certains organo-phosphorés, une réaction de déalkylation (appelée aussi vieillissement) se produit au niveau de l'enzyme phosphorylée et dans ce cas l'inhibition est irréversible.

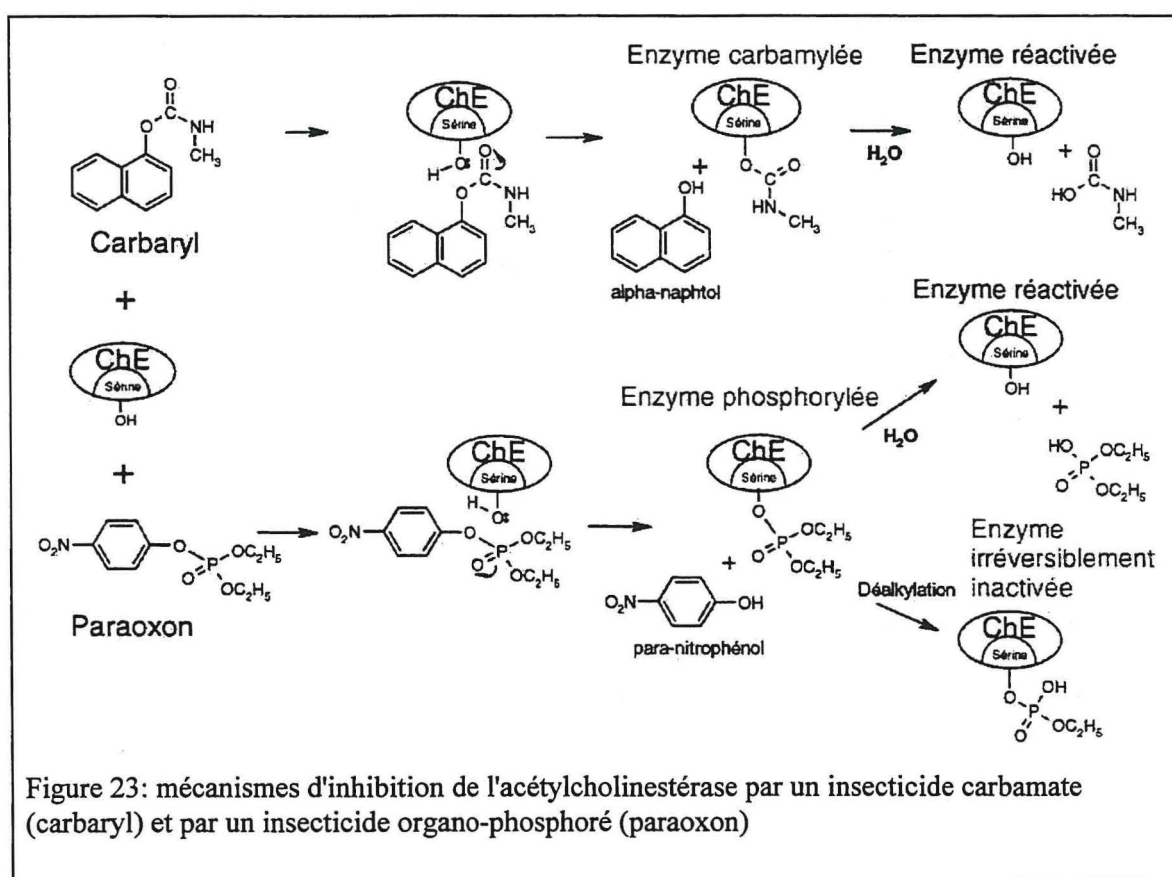


Figure 23: mécanismes d'inhibition de l'acétylcholinestérase par un insecticide carbamate (carbaryl) et par un insecticide organo-phosphoré (paraoxon)

2.4. RESISTANCE AUX INSECTICIDES : MECANISMES MIS EN JEU ET INVENTAIRE DES MUTATIONS

L'utilisation intensive des insecticides a favorisé la sélection d'individus présentant une acétylcholinestérase modifiée. Plus de 33 espèces d'insectes et d'acariens résistants ont été recensées (Fournier et Mutero, 1994). La modification de la cible se traduit par des changements des constantes cinétiques de l'enzyme, notamment une réduction de l'affinité de l'AChE pour les insecticides (Fournier et Mutero, 1994). *In vivo*, ces modifications n'empêchent pas la métabolisation du neurotransmetteur malgré la présence de l'insecticide, assurant ainsi la survie de l'insecte.

Deux types de modification peuvent conférer la résistance:

une modification de la quantité d'enzyme produite, résultat d'une surexpression de l'enzyme. Des tests toxicologiques effectués sur des souches de drosophile obtenues par transgénèse, exprimant des quantités variables d'AChE selon la souche, ont montré qu'il existait une corrélation entre cette quantité et le niveau de résistance à un insecticide organo-phosphoré, le malathion. Les niveaux de résistance atteints par les souches ayant les quantités d'enzyme les plus élevées restent faibles (Fournier *et al.*, 1992c).

une modification de la qualité de l'enzyme due à la présence de mutations ponctuelles de certains acides aminés. Plusieurs mutations responsables de l'insensibilité de l'enzyme à divers composés organo-phosphorés et carbamates ont été identifiées chez plusieurs insectes résistants (tableau 3 et figure 24). Ces mutations ont été obtenues en comparant les séquences du gène codant pour l'AChE chez des souches sensibles et résistantes.

Chez la drosophile (Fournier *et al.*, 1992c, Mutero *et al.*, 1994), il s'agit des mutations: F368Y (la phénylalanine 368, en numérotation drosophile est remplacée par une tyrosine), F115S, I199T, G303A. Ces mutations ponctuelles ont été introduites par mutagenèse dirigée dans l'AChE de drosophile produite *in vitro* et l'activité de ces enzymes recombinantes mesurée. Leur implication dans la résistance a été ainsi confirmée. Ces mutations confirment

aussi que le gène de l'AChE de drosophile est bien le gène impliqué dans la résistance aux insecticides.

Plusieurs mutations responsables de la résistance ont aussi été trouvées chez la mouche domestique (numérotation drosophile): V220L, G303A, F368Y, G406A (Devonshire *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1998).

Il n'existerait pour le moment qu'une seule mutation chez le doryphore (numérotation drosophile): S313G (Zhu *et al.*, 1996).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'implication de ces mutations dans la résistance. Dans le cas de F368Y, une des hypothèses serait la création d'une liaison hydrogène entre la tyrosine 368 et la sérine 276, ce qui entraînerait une diminution de la disponibilité de l'enzyme à catalyser l'insecticide. Dans d'autres cas, les acides aminés mutés entraîneraient une modification de la conformation de la protéine empêchant par exemple la reconnaissance de l'insecticide au niveau du site périphérique.

Mutero *et al.* (1992) ont testé l'effet de mutations au niveau de la tyrosine 109 chez l'AChE de drosophile et Krejci *et al.* (1991) au niveau de l'aspartate 397 de l'AChE de poisson-torpille. Dans tous les cas, les changements conférés par ces mutations ont certes diminué la sensibilité de l'enzyme vis à vis des insecticides mais ont affecté fortement la capacité de l'enzyme à dégrader l'acétylcholine et cette contrainte suggère d'une part que peu de mutations puissent être sélectionnées (Bourguet, 1996a) et que d'autre part on puisse retrouver les mêmes mutations chez des espèces différentes comme c'est le cas de la drosophile et de la mouche domestique (tableau 3).

Chez la drosophile, Mutero *et al.* (1994) ont montré que les mutations ponctuelles impliquées dans la résistance ne confèrent qu'un faible niveau de résistance et que seules les combinaisons de plusieurs mutations ont permis d'atteindre des niveaux élevés, suggérant que l'apparition de fortes résistances était la conséquence de recombinaisons intracistroniques de mutations pré-existantes.

Tableau 3: Situation des mutations associées à la résistance chez la drosophile, la mouche domestique et le doryphore (numérotation drosophile).

	F115S	I199V/T	V220L	G303A	S313G	F368Y	G406A
<i>D. melanogaster</i>							
Saltillo	X	X		X		X	
Bygdea		X		X			
Pierrefeu		X		X			
MH19						X	
<i>M. domestica</i>							
49R							X
CH2				X		X	
77M			X	X		X	
<i>L. decemlineata</i>					X		

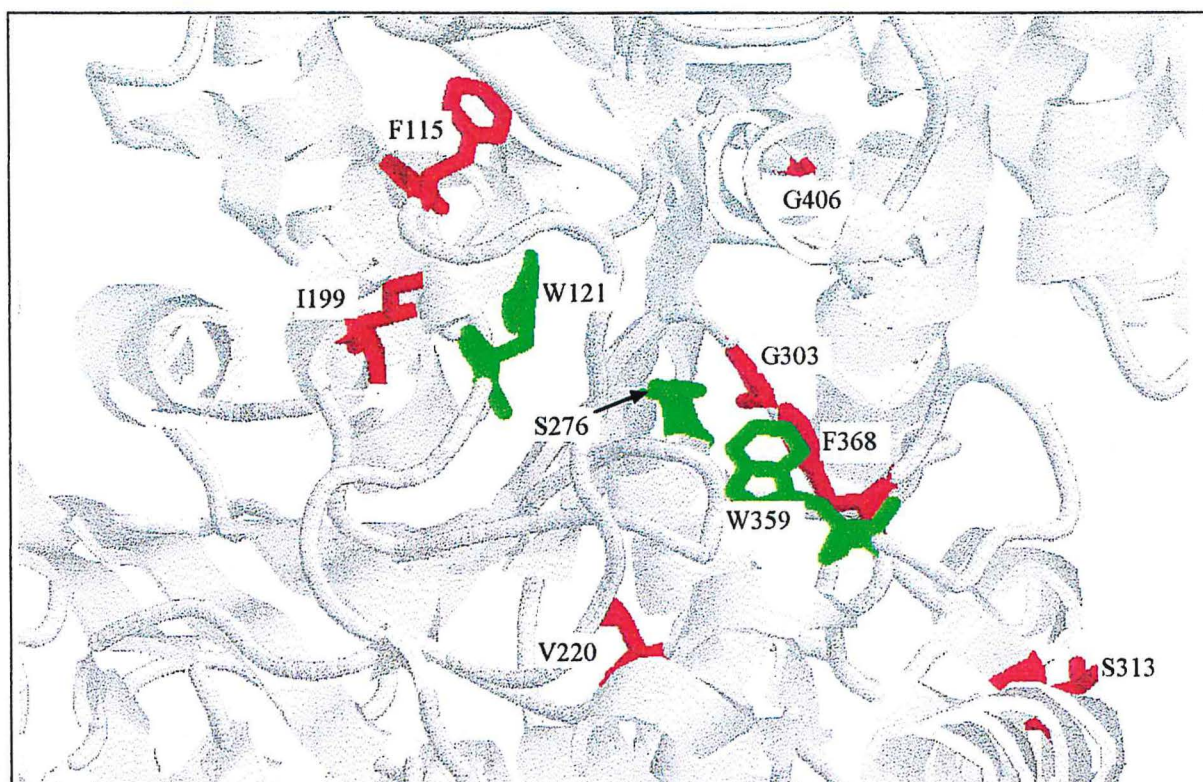


Figure 24: localisation sur l'ACHé de drosophile des mutations impliquées dans la résistance des insectes aux insecticides (en rouge). En vert, S276 au fond de la gorge du site actif, W121 et W359 à l'entrée de la gorge.

B. ESSAIS DE CLONAGE DU GENE CODANT POUR L'ACETYLCHOLINESTERASE SYNAPTIQUE CHEZ LE PUCERON *APHIS GOSSYPHII* Glover (HEMIPTERA, APHIDIDAE) ET LE MOUSTIQUE *CULEX PIPIENS* L. (DIPTERA, CULICIDAE).

1. ETAT DES CONNAISSANCES CHEZ *APHIS GOSSYPHII* ET *CULEX PIPIENS*

Le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* est un ravageur cosmopolite qui occasionne de sévères dégâts sur de nombreuses plantes cultivées (Leclant et Deguine, 1994) à travers le monde, principalement les malvacées, les cucurbitacées et les solanacées. 350 plante-hôtes d'*A. gossypii* ont été recensées. On le rencontre principalement en zone tropicale dans tous les continents mais aussi en zone tempérée. Par exemple, dans le sud de la France, *A. gossypii* s'observe sur melon et concombre.

Les dommages occasionnés par ce ravageur sont de trois types:

- * les formes immatures et les adultes, en prélevant la sève du phloème, affaiblissent de ce fait la plante infestée.

- * Le miellat sucré excrété endommage les fruits au moment de la récolte et souille par exemple la fibre de coton (Deguine, 1995). Le miellat qui se dépose sur la surface des feuilles est souvent envahi et noirci par un champignon par exemple du genre *Capnodium* ou *Cladosporium*, causant la fumagine qui dans les cas extrêmes affecte le processus de la photosynthèse et ainsi modifie la physiologie de la plante.

- * *A. gossypii* est vecteur de virus responsables de maladies qui affectent gravement de nombreuses plantes cultivées particulièrement en Amérique latine et dans les Caraïbes (Cauquil et Follin, 1983).

Les premiers cas de résistance du puceron *A. gossypii* aux insecticides impliquant une AChE insensible ont été mis en évidence en Angleterre avec le pyrimicarbe (carbamate) (Furk *et al.*, 1980). D'autres cas de résistance de ce puceron aux insecticides ont été répertoriés: Sun *et al.*, 1987; Gubran *et al.*, 1992; Silver, 1995; Moores *et al.*, 1996a et 1996b; Delorme *et al.*, 1997. Sur la souche résistante originaire du Sud de la France (Pernes-

les-Fontaines en Provence), il a été observé un facteur de résistance au pyrimicarbe de 1350 par rapport à une souche sensible originaire de Navacelles en Provence (Delorme *et al.*, 1997). D'autres insecticides ont été testés (Villatte, 1998) et il a été observé que la souche résistante l'est moins à d'autres composés tels que le mevinphos (O.P.). De plus, une résistante croisée négative a été notée vis à vis du carbofuran (carbamate) et du bendiocarbe (carbamate) (Villatte *et al.*, 1999).

Le moustique *Culex pipiens* est cosmopolite. Il sévit particulièrement dans les régions tropicales où il est le vecteur de filarioses et d'arbovirus mais il affecte aussi les régions tempérées par la gêne occasionnée par ses piqûres douloureuses. *C. pipiens* est considéré comme un complexe d'espèces qui comprend deux formes principales: une forme tempérée *C. p. pipiens* et une forme tropicale *C. p. quinquefasciatus*.

De nombreux cas de résistance par modification de l'AChE concernant *C. pipiens* ont été observés dans différentes régions: en France (Raymond *et al.*, 1986); en Italie (Severini *et al.*, 1993); à Chypre (Wirth et Georghiou, 1996) et en Afrique de l'Ouest (Chandre *et al.*, 1997).

Deux acétylcholinestérases (appelées AChE1 et AChE2) ont été mises en évidence chez *C. pipiens* (Bourguet, 1996a ; Bourguet *et al.*, 1996b; Bourguet *et al.*, 1998b) pour la souche S-LAB, sensible aux insecticides O.P. et carbamates (par rapport aux souches résistantes sélectionnées).

Les principales différences entre ces deux enzymes sont les suivantes :

- migration électrophorétique en gel d'acrylamide non dénaturant : AChE1 migre plus lentement que AChE2
- très faible sensibilité de AChE2 au propoxur (20000 fois moins que AChE1) alors que la souche S-LAB est sensible à cet insecticide, ce qui voudrait dire que AChE2 ne serait pas impliquée dans la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses. Cette enzyme aurait une autre fonction qu'il reste à découvrir.

Ces deux enzymes ont des formes moléculaires identiques (dimère amphiphile + dimère hydrophile) suggérant que les deux enzymes seraient peu différentes l'une de l'autre. Le changement d'un ou de quelques acides aminés peut suffire pour modifier à la fois la mobilité électrophorétique de l'enzyme (résultat d'un changement de charges électriques) et sa sensibilité aux insecticides.

Les travaux concernant le gène codant pour l'acétylcholinestérase chez *C. pipiens* ont débuté en 1992 (Malcolm *et al.*, 1992) où le couple d'amorces F et G, définies à partir de zones conservées de séquences peptidiques de différentes séquences d'AChE de vertébrés et d'*Anopheles stephensi* (EEMWNP pour l'amorce F et WIYGGG pour G), a permis d'obtenir par PCR un fragment de 580 pb. Ce fragment, qui encadre l'intron 3 (par convention chez la drosophile, noté intron 2 chez *Culex*), a été partiellement séquencé. Il présente une homologie forte avec le fragment correspondant chez *A. stephensi*. Ce fragment a été utilisé comme sonde pour cribler une banque non amplifiée d'ADN génomique de la souche résistante MSE de *C. pipiens*. Les clones positifs ont été partiellement séquencés (Malcolm *et al.*, 1998).

La séquence peptidique des exons 2 à 5 du gène cloné par Colin Malcolm présente d'une part une homologie nucléotidique de 93% avec les exons correspondants d'*A. stephensi* et d'autre part les caractéristiques d'un gène codant pour une AChE.

Les introns 3 et 4 de ce gène ont respectivement les tailles suivantes: 350 et 86 pb. Leur position est identique à celle d'*A. stephensi* et de la drosophile.

Il a été observé, comme chez le moustique *Anopheles stephensi*, la présence d'un intron surnuméraire (3') interrompant l'exon 4. La taille de l'intron 3' est de 80 pb.

L'étude de l'hérédité du gène cloné par Colin Malcolm a permis de mettre en évidence chez *C. pipiens* deux gènes distincts appelés *Ace1* et *Ace2* codant respectivement pour l'enzyme AChE1 et AChE2 (Bourguet, 1996a; Malcolm *et al.*, 1998). Les croisements entre la souche résistante MSE de *C. pipiens pipiens* et la souche sensible S-LAB de *C. pipiens quinquefasciatus* ont été réalisés. Les techniques ont été les suivantes:

- RFLP sur ADN génomique : L'ADN génomique des souches parentales et des croisements a été coupé par l'enzyme de restriction *EcoRI* qui permet de discriminer les allèles des deux souches parentales. La sonde utilisée a été un fragment PCR de 700 pb (encadrant l'intron 3) obtenu avec les amorces spécifiques (F1457 et B1246) du gène de *C. pipiens* cloné par Colin Malcolm (Malcolm *et al.*, 1998).
- RFLP sur produits PCR : Le fragment PCR de 700 pb ci-dessus contient un site de restriction *ScaI* au début de l'intron 3 qui permet de discriminer les deux sous-espèces (Bourguet *et al.*, 1998). L'analyse des profils d'amplification après digestion par l'enzyme *ScaI* a permis de suivre la transmission du gène codant pour l'AChE.
- Mesure de l'activité enzymatique : de l'enzyme AChE1 dans les croisements entre MSE et S-LAB (l'enzyme AChE2 chez ces deux souches ayant le même niveau de résistance au propoxur 5×10^{-4} M). L'AChE1 de S-LAB est sensible au propoxur à cette concentration alors que l'AChE de MSE est totalement insensible.

Les résultats ont été les suivants:

- le gène *Ace2* est lié au locus sexuel localisé sur le chromosome I et n'est pas impliqué dans la résistance aux insecticides. Ce gène correspond au gène cloné par Colin Malcolm.
- le gène *Ace1* a une transmission autosomale, est impliqué dans la résistance et est situé sur le chromosome II (où se trouve le locus *Plum eye*) mais la séquence de ce gène reste à découvrir.
- *Ace1* et *Ace2* codent respectivement pour les enzymes AChE1 et AChE2. AChE2 ne serait pas la cible des insecticides O.P. et carbamates. Cette enzyme n'a pas été sélectionnée car le niveau de résistance à un insecticide (le propoxur) à la fois chez une souche sensible et chez une souche résistante (sélectionnée par pression insecticide) est identique.

Banks *et al.* (1996) ont noté l'absence de l'intron 3' chez la mouche des fruits *Ceratitis capitata*, le moustique *Anopheles albimanus* et la drosophile alors qu'on l'observe chez *C. pipiens* et *A. stephensi*. A propos de l'absence de cet intron chez certains diptères, Banks *et al.* (1996) ont émis les hypothèses suivantes: soit l'intron 3' a pu être tout simplement perdu,

soit les gènes ne sont pas les mêmes. Ainsi, cet intron surnuméraire pourrait être un indice supplémentaire pouvant conforter l'idée de l'existence d'un autre gène chez les moustiques *C. pipiens* et *A. stephensi*.

2. OBJECTIFS

Si de nombreuses études biochimiques ont été réalisées sur l'acétylcholinestérase d'insectes, les travaux au niveau moléculaire restent limités à quatre espèces de Diptères : la drosophile *Drosophila melanogaster*, la mouche domestique *Musca domestica* et deux moustiques *Anopheles stephensi* et *Aedes aegypti* et à un seul Coléoptère d'importance agricole, le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*. Ces travaux ont permis d'identifier les mutations qui jouent un rôle dans la résistance chez la drosophile, la mouche domestique et le doryphore.

D'un point de vue fondamental, la connaissance des mutations, de leur position sur le gène et des combinaisons de mutations, peut aider à la compréhension des mécanismes qui ont conduit à la sélection des gènes de résistance.

D'un point de vue appliqué, la détection des mutations sur des individus prélevés dans la nature, permet de connaître la fréquence des mutations au sein d'une population et d'apprécier la dispersion géographique de ces mutations. Ainsi, il est possible de prédire les risques de généralisation du problème de la résistance pour une situation donnée.

Dans le cadre de cette thèse, les travaux ont concerné deux insectes importants, d'un point de vue agricole (*A. gossypii*) et d'un point de vue de la santé publique (*C. pipiens*), pour lesquels des problèmes de résistance sérieux se posent et dont le gène codant pour l'AChE reste à découvrir. Avec la mise en évidence de deux AChEs chez *C. pipiens* (Bourguet *et al.*, 1996a), l'intérêt de travaux au niveau moléculaire pour vérifier l'hypothèse de l'existence de plusieurs gènes n'en a été que plus important.

3. LES STRATEGIES ADOPTEES

L'identification des mutations impliquées dans la résistance nécessite au préalable le clonage du gène codant pour l'AChE chez *A. gossypii* et *C. pipiens*.

Comme il n'existait pas d'informations sur la séquence de l'enzyme de ces insectes, la stratégie a été de cloner le gène par PCR en utilisant des couples d'amorces définies dans des régions où la séquence peptidique du gène codant pour l'AChE est conservée chez différents organismes vertébrés et invertébrés ("boîtes conservées").

En l'absence de connaissance de la structure du gène (notamment le nombre et la taille des introns), les travaux de clonage ont été effectués sur l'ADNc. Des amorces (dégénérées ou non) définies dans les zones conservées ont été essayées ainsi que des amorces "anti-pasa".

Par cette stratégie, c'est le gène *Ace2*, non impliqué dans la résistance aux insecticides qui a été retrouvé. Il a été émis l'hypothèse que ce gène pouvait être sur-transcrit par rapport au gène *Ace1* recherché.

La stratégie suivante a donc été d'essayer de cloner par PCR le gène *Ace1* à partir d'ADN génomique en utilisant toutes sortes de combinaisons d'amorces, non seulement des amorces définies dans les zones conservées mais aussi d'autres types amorces (amorces "anti-pasa" et amorces spécifiques de l'AChE de drosophile).

4. LES TRAVAUX REALISES

4.1. MATERIELS ET METHODES

Les insectes étudiés:

Deux souches du puceron *Aphis gossypii*, élevées au Laboratoire Mode d'action des Insecticides et Phénomènes de résistance de l'Unité de Phytopharmacie de l'INRA de

Versailles, ont été utilisées : une souche sensible, originaire de Navacelle (Provence) et une souche résistante au pyrimicarbe, originaire de Pernes-les-Fontaines (Provence). Villatte (1995) a montré que l'acétylcholinestérase des individus résistants était peu inhibée par le pyrimicarbe. Il a été émis l'hypothèse que le mécanisme de résistance était dû à une modification de l'AChE.

Les souches (tableau 4) de *Culex pipiens* proviennent du Laboratoire Génétique et Environnement de l'Institut des Sciences de l'Evolution de l'Université Montpellier II où elles sont maintenues en élevage. Toutes les souches résistants présentent une AChE peu inhibée par les insecticides O.P. et carbamates (Bourguet, 1996a).

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes souches de *Culex pipiens*

souche	sous-espèce	pays d'origine	sensibilité aux O.P. et carbamates
PRAIAS	<i>pipiens</i>	Portugal	résistant
ESPRO	<i>pipiens</i>	Tunisie	résistant
PADOVA	<i>pipiens</i>	Italie	résistant
TC	<i>pipiens</i>	France	résistant
GARA	<i>pipiens</i>	Tunisie	résistant
TEMR	<i>quinquefasciatus</i>	Etats Unis	sensible
MRES	<i>quinquefasciatus</i>	Cuba	résistant
S-LAB	<i>quinquefasciatus</i>	Etats Unis	sensible

Extraction d'ARN :

ARN total :

L'ARN total a été extrait d'environ 20 mg de larves/nymphes ou d'adultes (uniquement chez *C. pipiens*) en broyant les insectes dans une solution contenant un mélange de phénol, d'isothiocyanate de guanidium (RNA B de Bioprobe) à pH 4 et de chloroforme puis en précipitant l'ARN à l'isopropanol. L'ARN total a été remis en suspension dans 20 µl de T.E. pH8 (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Une autre technique plus rapide a été d'utiliser le RNeasy mini kit (Qiagen) qui est basé sur le même principe d'extraction mais l'ARN, retenu sur une colonne d'affinité en est détaché par une solution de faible force ionique (T.E. pH8).

ARN messagers :

l'ARNm a été extrait de l'ARN total par contact (batch) avec de la cellulose oligo-dT puis élué dans 100 µl d'une solution de T.E. pH8, chauffée à 70°C. Le surnageant a été précipité dans de l'éthanol 95° à -20°C en présence d'acétate d'ammonium et repris dans 30 µl d'eau.

Préparation d'ADN :

Synthèse de l'ADNc :

le kit de Pharmacia Biotech « first-strand cDNA synthesis » a été utilisé selon la technique du multiamorçage au hasard avec un mélange d'héxanucléotides (pd[N]₆) pour l'obtention d'ADNc simple brin à partir de l'ARN total. L'amorce NotI-d(T)₁₈ (5' AAC TGG AAG AAT TCG CCG CCG CAG GAA T₁₈ 3') qui s'hybride sur la queue polyadénylée de l'ARNm a été utilisée pour obtenir l'ADNc à partir de l'extrémité 3' du gène étudié.

Préparation de l'ADN génomique :

Deux techniques d'extraction ont été employées : l'extraction de l'ADN d'un seul individu a été faite en présence de CHELEX 100 (Walsh *et al.*, 1991), résine qui a la propriété d'empêcher l'action des DNAses en chélatant les ions métalliques nécessaires à leur activité. Dans le cas de plusieurs individus, l'extraction de l'ADN a été faite en présence d'un mélange de phénol et de chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol 95°.

▲ extraction en présence de CHELEX : l'insecte a été broyé dans 50 µl de CHELEX 100 10% (Sigma). Le broyat est mis à incuber 30 minutes à 55°C pour permettre l'action de protéases puis 10 minutes à 100°C pour dénaturer les protéines. L'ADN en solution est récupérée après centrifugation à 10000 t/min. pendant 10 minutes.

▲ extraction phénol-chloroforme : les insectes sont broyés dans 1 ml NIB (0.1 M NaCl, 30 mM Tris pH8, 10 mM EDTA, 0.07% β -mercaptoéthanol, 0.5% Nonidet P40). Après 1 minute de centrifugation à 8000 t/min., le culot est lavé dans 1 ml NIB et recentrifugé 1 minute. Le culot est remis en suspension dans 0.8 ml HB (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA et 3.5% sucrose) à laquelle on ajoute 0.2 ml LB (125 mM EDTA, 1 M Tris pH 9.2, 2.3% sodium dodécyl sulfate). Le mélange est traité au phénol(pH7)-chloroforme. Après centrifugation, la phase aqueuse est débarrassée des traces de phénol-chloroforme par du diéthyl éther puis mélangée à 2.5 volumes d'éthanol 95° et mise à -20°C puis centrifugée. L'ADN est remis en suspension dans une solution TE pH8.

Polymerase Chain Reaction (PCR) :

Des fragments amplifiés ont été obtenus par PCR soit avec le thermocycleur Thermojet d'Eurogentec soit avec le thermocycleur 9700 de Perkin Elmer. En 1999, des PCR ont été effectuées sur le thermocycleur "T-Gradient" de Biométra qui offre l'avantage de pouvoir tester une gamme de températures d'hybridation en une seule fois.

Les conditions PCR ont été étudiées chaque fois que cela a été nécessaire: température et durée d'hybridation (30 secondes-1 min30s à 45-60°C); nombre de cycles(35-45 cycles) après dénaturation des brins d'ADN pendant 10 secondes à 94°C, durée de polymérisation (1 min30s à 2 minutes) à 72°C. Les réactions PCR ont été réalisées dans une solution contenant un tampon (75mM Tris HCl pH9, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% (W/V) Tween 20), 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 mM dNTP, 0,4-0,8 mM de chaque amorce, 0,5 u de Taq Polymérase (Goldstar d'Eurogentec). Il faut noter que les PCR sur ADN génomique n'ont donné des fragments amplifiés que si le temps d'hybridation était au minimum de 1 minute.

Technique de SOUTHERN :

Certains fragments amplifiés par PCR ont été transférés durant 12 heures sur membrane nylon (Hybond-N+, d'Amersham) après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% ayant été préalablement trempée 15 minutes dans une solution 0.4 M NaOH.

1 codant pour une des AChEs du nématode *C. elegans*. Les sondes ont été marquées au ^{32}P avec le kit « multiprime DNA labelling system » d'Amersham. Après hybridation une nuit à 37 ou 55°C, la membrane est lavée en condition de faible stringence (30 minutes à 65°C, 2% SSPE, 0,2% SDS) puis de forte stringence (30 minutes à 65°C, 0,2% SSPE, 0,2% SDS) suivi d'une exposition d'un film autoradiographique durant 12 heures à -80°C.

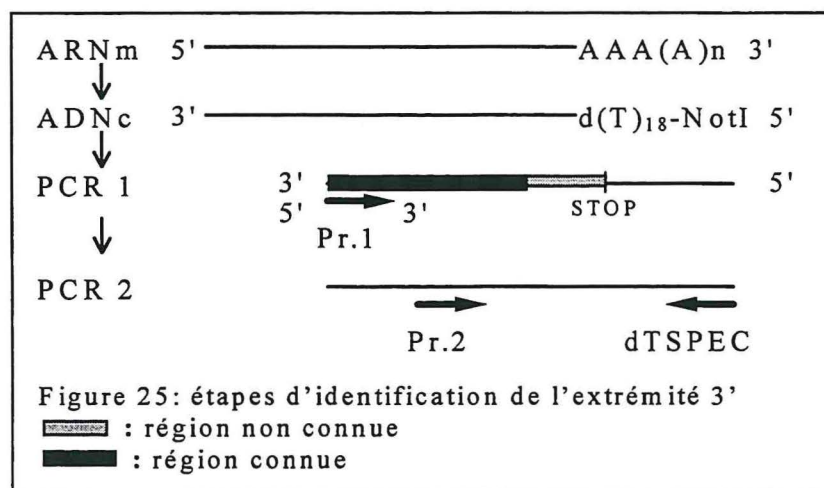
Identification des extrémités 3' et 5' du gène à partir des ADNc :

Extrémité 3' (figure 25):

L'ADNc a été obtenu en utilisant l'amorce NotI-d(T)₁₈ qui s'hybride sur la queue polyadénylée des ARN messagers.

Une première PCR a été réalisée en utilisant une seule amorce sens (Pr.1) spécifique de la partie déjà identifiée du gène. L'amorce reverse était l'amorce NotI-d(T)₁₈ mais celle-ci n'a pas été rajoutée au mix PCR, le mix de l'ADNc contenant suffisamment d'amorce libre n'ayant pas servi à fabriquer l'ADNc.

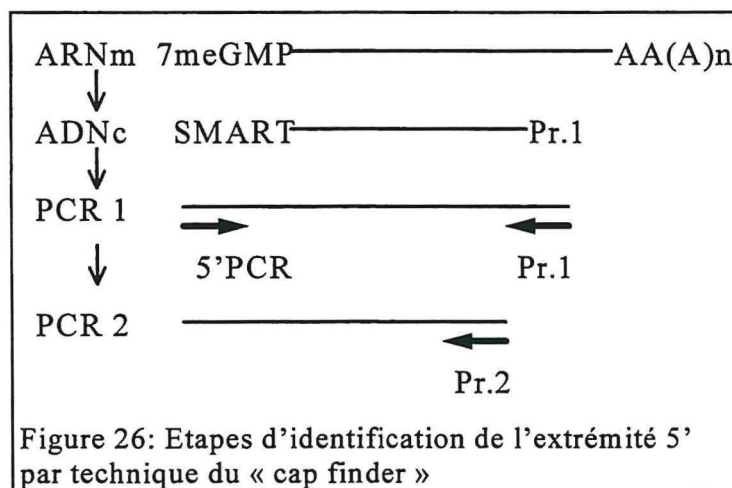
Une deuxième PCR semi-emboîtée a été réalisée en utilisant l'amorce reverse dTSPEC (3' G GAC GCC GGC GCT TAA GAA GGT CAA 5') spécifique de NotI-d(T)₁₈ et une amorce spécifique sens interne (Pr.2) pour être certain d'amplifier spécifiquement le gène recherché.



Extrémité 5' :

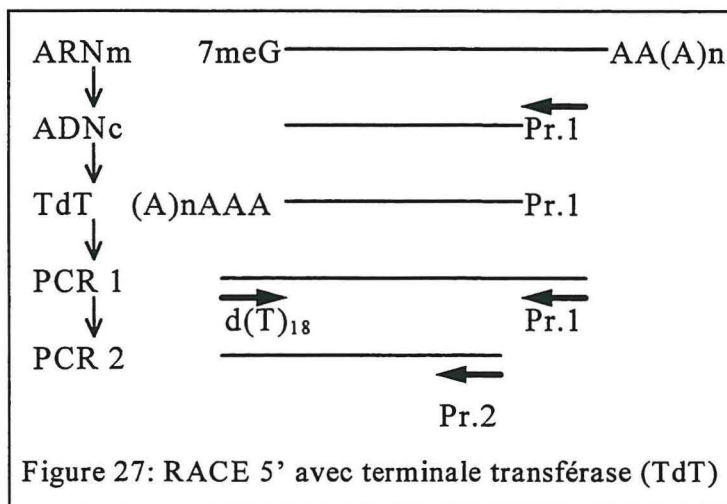
Différentes techniques ont été essayées (Schaefer,1995):

▲ technique de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) développée par Clontech (technique dite du "cap finder")(figure 26). La réaction de transcription inverse a été effectuée en présence à la fois de l'oligonucléotide « SMART » qui se fixe sur la coiffe de l'ARNm (7-méthyl guanosine monophosphate) et d'une amorce reverse spécifique de la partie du gène déjà identifiée (Pr.1). Une première PCR a été réalisée avec l'amorce « 5'PCR » qui s'hybride spécifiquement sur SMART et l'amorce spécifique reverse. Elle a été suivie d'une PCR semi-emboîtée avec 5'PCR et une amorce spécifique reverse interne.

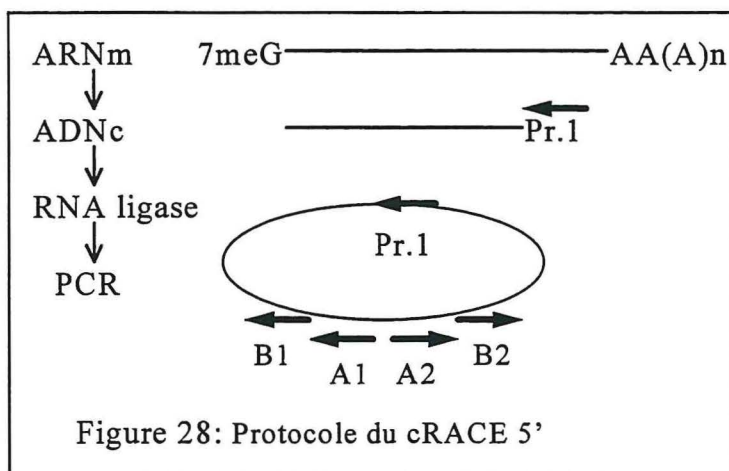


▲ RACE 5' avec terminale transférase (TdT) (figure 27): adjonction sur l'extrémité 5' du cDNA, après reverse-transcription du mRNA correspondant avec une amorce reverse spécifique (Pr.1), d'une séquence polyadénylée grâce à une terminale transférase (TdT) puis amplification par deux PCR successives:

- une première PCR en utilisant un oligodT qui s'hybride sur la séquence polyadénylée et une amorce spécifique (Pr.1)
- une deuxième PCR avec un oligodT et une amorce spécifique interne (Pr.2)



▲ cRACE (circular first-strand cDNA-mediated RACE) selon la technique de Maruyama *et al.* (1995) (figure 28). Cette technique consiste à synthétiser l'ADNc comme précédemment mais avec l'amorce spécifique (Pr.1) préalablement phosphorylée par la T4 polynucléotide kinase, puis à circulariser l'ADNc à l'aide d'une RNA ligase. Ensuite, deux PCR ont été effectuées: une première PCR avec deux amorces spécifiques opposées (A1 et A2) (technique de la PCR "inverse") et une deuxième PCR avec deux amorces externes opposées (B1 et B2).



Clonage et séquençage :

Purification des ampliats :

Les fragments choisis ont été purifiés par électroélution en présence de NaOAc 3M puis précipités dans de l'éthanol 95° à -20°C après traitement au phénol/chloroforme. Le kit de Qiagène « QIAquick gel extraction kit » a aussi été utilisé : les fragments de gel d'agarose contenant les bandes amplifiées sont dissous à 50°C dans une solution contenant du NaI puis purifiées sur une colonne d'affinité.

Clonage :

Les fragments ont été clonés selon deux techniques : soit par "T-A cloning" soit par clonage "à extrémités franches" (blunt).

▲ Dans le cas du « T-A cloning », les produits PCR purifiés (200 ng en moyenne) ont été ligaturés par 3u. de T4 DNA ligase à 50 ng du plasmide PGEM-T (Promega), PCRII (Invitrogen), ou Blue Script SK- (coupé par EcoR V et auquel on a rajouté en 3' une thymine en utilisant de la Taq polymérase en présence de dTTP). Ces vecteurs doubles brins linéarisés ont, à chaque extrémité 3', une thymine surnuméraire. La présence de cette base facilite la ligation des produits ayant été amplifiés par la Taq polymérase (une des caractéristiques de cette enzyme est d'avoir une activité terminale transférase en rajoutant aux extrémités 3' d'un ADN double brin préférentiellement une adénine). Ces vecteurs possèdent le marqueur de sélection à l'ampicilline et le gène codant pour le peptide α de la β -galactosidase.

▲ Dans le clonage "à extrémités franches", le vecteur Blue Script SK⁻ (50 ng/ml) a été coupé au niveau du polylinker soit par EcoR V soit par Sma I, deux enzymes qui créent des coupures franches. Les extrémités 5' ont été déphosphorylées par la phosphatase alcaline pour ne pas qu'il se recircularise. Les fragments amplifiés ont dû être au préalable traités : élimination des extrémités cohésives par 1.5 u. de T4 DNA polymérase en présence de dNTP

0.25 mM puis phosphorylation des extrémités 5' par 5 u. de T4 polynucléotide kinase en présence d'ATP 10 mM. Ce vecteur possède le marqueur de sélection à l'ampicilline ainsi que le gène codant pour peptide α de la β -galactosidase.

Les produits de ligation ont été introduits par choc électrique (électroporation) ou choc thermique (heat shock), dans les bactéries TG1 (Stratagene) ou XL-1 blue (Stratagene), dont la compétence était en moyenne de 10^7 colonies par mg d'ADN. Les bactéries transformées ont été mises en culture à 37°C pendant une heure dans une solution NZY (NZ-amine 1%, NaCl 0,5%, casamino acids 0,1%, $MgSO_4$ 0,25%, yeast extract 0,5%) puis étalées sur boîtes d'Agar MacCONKEY 5% contenant 400 mg/ml d'ampicilline. Les colonies recombinantes blanches (celles n'ayant pas exprimé la β -galactosidase) ont été criblées principalement par PCR et plus rarement par digestion enzymatique (SphI-SalI, SphI-PstI, SacII-SacI) des minipréparations de plasmide.

Les minipréparations de plasmides ont été obtenues à partir d'une colonie isolée mise en culture dans 5 ml de solution NZY + ampicilline (400 μ g/ml) pendant 12 heures à 37°C. Les plasmides ont été purifiés sur colonnes d'affinité (kit Qiagène) après lyse alcaline des bactéries.

Le séquençage, selon la technique de Sanger (T7 sequencing kit de Pharmacia Biotech avec dATP α ^{35}S) a été réalisé, lorsque le clonage a été effectué dans TG1, sur des plasmides simples brins (S.B.) obtenus à l'aide du phage M13-KO7 à partir des colonies bactériennes recombinantes. Une colonie était prélevée et mise en contact avec 10 μ l de M13-KO7 (10^{10} pfu) dans 50 μ l de solution NZY pendant 20 minutes à température ambiante. 200 μ l de NZY + ampicilline (400 μ g/ml) étaient ajoutés pour une pré-culture à 37°C pendant 60 minutes. On ajoutait ensuite 10 ml de NZY + ampicilline (400 μ g/ml) et 16 ml de kanamycine 50mg/ml pour une culture à 37°C pendant 12 heures. Les phages étaient précipités par 1 ml de 20% polyéthylène glycol (PEG 6000) + acétate d'ammonium 3.5 M. Les plasmides simples brins ont été récupérés après extraction au phénol et précipitation à l'éthanol 95° en présence d'acétate d'ammonium 5 M.

Dans le cas d'un clonage dans XL-1 blue, les réactions de séquences ont été effectuées sur les plasmides double brins (D.B.) purifiés sur colonne d'affinité Qiagène (minipreps ou maxipreps).

Les séquences ont été visualisées sur un film autoradiographique après électrophorèse sur gel 8% acrylamide-0,2% bisacrylamide-50% urée. Au maximum 200 pb ont pu être lues pour chaque réaction de séquence.

4.2. RESULTATS

Les résultats des différentes stratégies de clonage du gène chez *A. gossypii* et *C. pipiens* sont détaillés ci-après.

4.2.1. Clonage à partir de l'ADN complémentaire

4.2.1.1. Clonage à partir d'amorces de vertébrés et d'invertébrés définies dans les "boîtes conservées"

Dans cette stratégie deux types d'amorces définies dans des "boîtes conservées" du gène de l'AChE ont été utilisés:

- des amorces de grande taille (supérieure à 24 nt) dont la séquence nucléotidique est déduite de séquences peptidiques. Ces amorces sont non dégénérées c'est à dire qu'elles n'ont qu'une seule combinaison de nucléotides.
- des amorces dégénérées de taille variable allant de 18 à 27 nt. Ces amorces sont dites dégénérées car elles tiennent compte qu'un même acide aminé peut être codé par plusieurs codons différents.

Les amorces de grande taille offrent l'avantage d'espérer cloner spécifiquement le gène de l'AChE. L'emploi d'amorces dégénérées se justifie pour accroître les chances d'hybridation, la séquence nucléotidique des acides aminés variant d'une espèce à l'autre.

Amorces utilisées et résultat des PCR:

Six amorces non dégénérées B1 à B6 (séquences en annexe X), ont été élaborées à partir des régions conservées entre le gène de l'AChE de la drosophile (*Drosophila*

melanogaster) et du poisson torpille (*Torpedo californica*) d'après l'alignement des séquences peptidiques (Hall et Spierer, 1986). Les séquences nucléotidiques ont été déduites en tenant compte des recommandations de Lathe (1985) quant au choix de la troisième base du codon.

Treize amorces dégénérées du gène de l'AChE ont été testées. Elles proviennent du Laboratoire Génétique et Environnement de l'Université Montpellier II et du groupe Cholinestérases du Laboratoire de Physiologie Animale de l'INRA de Montpellier. La liste des amorces ainsi que leur séquence nucléotidique se trouve en annexe 1.

La position relative des amorces utilisées est indiquée dans la figure 29.

Les combinaisons des 19 amorces ont été testées sur l'ADNc des deux souches d'*A. gossypii* (résistante et sensible) et sur les souches de *C. pipiens* TC (résistante) et TEMR (sensible). Cette même stratégie a aussi concerné l'aleurode *Bemisia tabaci* et le carpocapse des pommes *Laspeyresia pomonella* mais aucune amplification n'a été obtenue.

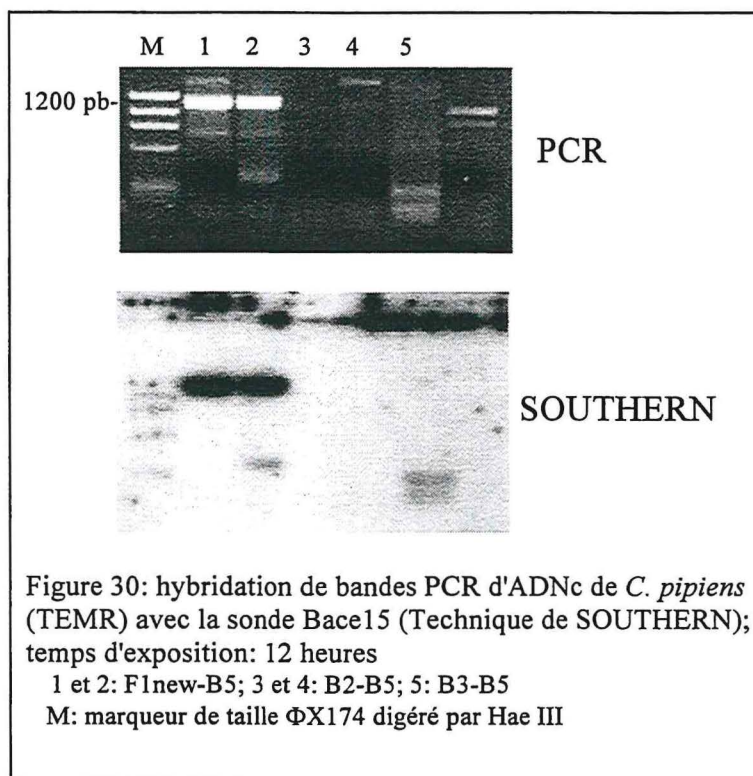
Le couple d'amorces F1new-B5 a donné les fragments amplifiés de taille attendue (1143 pb), à la fois chez *A. gossypii* et *C. pipiens*..

F1new (sens) :	5'	GGC	GAA	GAA	ATG	TGG	AAC	CC	3'
			G	G			T		
séquence peptidique F1new		G	E	E	M	W	N	P	
séq. pept. p. torpille		G	S	E	M	W ₍₈₄₎	N	P	
séq. pept. drosophile		G	E	E	I	W ₍₁₂₁₎	N	P	

B5 (rev) :	5'	CC	ATG	CAG	CAC	GCC	CAT	CCA	CTC	GCC	CCA	3'
seq.pept.B5		W	G	E	W	M	G	V	L	H	G	
p.torp.		W	P	E	W	M	G	V	I	H	G	
droso.		W	G	E	W	M	G	V	L	H	G	

Diagnostic par la technique de Southern:

Le plasmide recombinant PX contenant le gène codant pour l'AChE de drosophile et le plasmide recombinant Bace15 contenant le gène ace1 pour l'AChE du nématode *C. elegans* ont été utilisés comme sondes. Ces sondes ont hybridé des fragments PCR obtenus avec le couple d'amorces F1new-B5, aussi bien chez *C. pipiens* que chez *A. gossypii*. Le résultat de l'hybridation avec la sonde Bace15 de F1new-B5 de *C. pipiens* est illustré dans la figure 30. L'hybridation avec ces sondes en conditions de forte stringence, indique que le fragment amplifié F1new-B5 est probablement un gène codant pour l'AChE.



Le fragment F1new-B5 a été cloné. Deux clones ont été obtenus et séquencés:

- le clone AgR1 de la souche résistante d'*A. gossypii*
- le clone TEMR14 de la souche sensible TEMR de *C. pipiens*.

La connaissance de la séquence nucléotidique de ces clones, a permis d'élaborer des amorces spécifiques de ce gène afin de cloner les extrémités 5' et 3' du gène. Le clonage de ces extrémités a uniquement été réalisé chez *A. gossypii*.

Clonage de l'extrémité 3':

Deux amorces spécifiques du gène cloné d'*A. gossypii* ont été employées: QYS, correspondant à Pr.1 et FTH, correspondant à Pr.2:

QYS (sens):	5'	CAG	TAT	TCG	GGA	TGG	GAA	3'
séquence peptidique		Q	Y	S	G	W	E	
FTH (sens):	5'	TTC	ACT	CAC	AGG	ACC	GAC	3'
séquence peptidique		F	T	H	R	T	D	

Le clone AgR11 a été obtenu et l'extrémité 3' a été séquencée dans sa totalité jusqu'au codon stop (TAA), soit 426 pb en aval de l'amorce B5.

Clonage de l'extrémité 5':

Une partie de l'extrémité 5' a été identifiée par la technique de RACE développée par la société Clontech:

Les amorces GDL, correspondant à Pr.1 et MSG, correspondant à Pr.2, toutes deux spécifiques du gène cloné d'*A. gossypii* ont été utilisées.

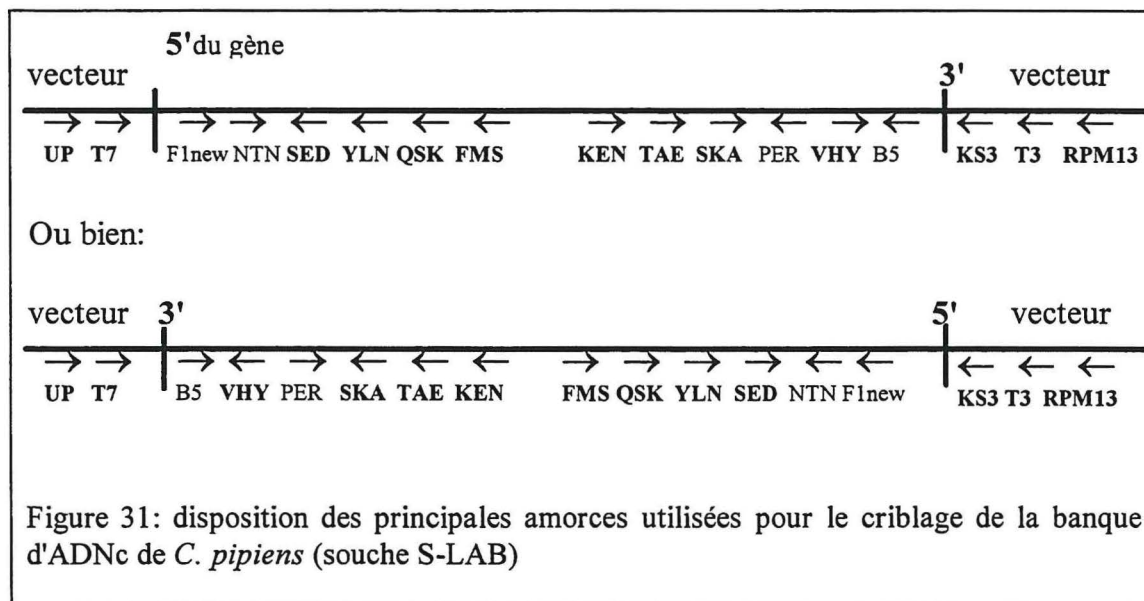
Amorce reverse GDL :	3'	CCG	CTA	AAT	AAC	CGC	CGA	5'
séquence peptidique :		G	D	L	L	A	A	
Amorce reverse MSG :	3'	TAC	AGG	CCA	TGA	AGC	TGT	5'
séquence peptidique :		M	S	G	T	S	T	

La technique du cap finder n'a pas permis d'identifier complètement l'extrémité 5' jusqu'au codon d'initiation. Seuls 78 pb en amont de F1new (sur un total estimé à environ 350 pb) ont pu être ainsi séquencés (clone AgR48). Il semblerait que le "cap finder" n'ait pu s'hybrider spécifiquement au niveau de la coiffe mais plus en aval.

Les autres techniques de RACE en 5', cRACE et la technique utilisant la terminale transférase, n'ont pas données de bandes amplifiées par PCR aux tailles attendues.

Criblage par PCR d'une banque d'ADNc de *C. pipiens*:

Parallèlement, un criblage par PCR d'une banque d'ADNc pleine taille de *C. pipiens*, a été effectué en 1997 (la banque a été réalisée au sein du laboratoire par L. Paquereau) pour connaître les extrémités 5' et 3' du gène. Pour cela, des PCR suivies de PCR emboîtées (nested-PCR) ont été effectuées en combinant des amorces du vecteur (T3, KS3, T7, UP et RPM13) avec des amorces spécifiques de *C. pipiens* (SED, YLN, QSK, FMS, KEN, TAE, SKA, VHY) (figure 31). Au total, 18 combinaisons d'amorces ont été testées. Les PCR ont été effectuées sur des dilutions successives de la banque. De plus, les couples d'amorces F1new-B5 et NTN-PER ont été essayés à titre de témoins.



Il n'a pas été obtenu d'amplification aux tailles minimales attendues même avec les couples d'amorces témoins. Soit les conditions PCR n'ont pas assez été travaillées (facteurs de dilution de la banque, choix des amorces), soit la représentativité de la banque n'était pas suffisante.

L'absence de résultats par PCR est la raison principale qui a conduit à ne pas effectuer sur cette banque un criblage par hybridation.

Analyse des séquences des clones AgR48, AgR1 et AgR11 d'*A. gossypii*:

La séquence reconstituée de 1647 pb, correspondant aux séquences des clones AgR48, AgR1 et AgR11, présente une homologie de 51 % avec celle de la drosophile (figure 32). On note la présence des acides aminés caractéristiques de l'acétylcholinestérase: triade catalytique, F368(290), les six cystéines assurant les ponts disulfures, W359(279) et surtout W121(84) associée à la chaîne peptidique 118-127.

Le profil d'hydropathie de la séquence peptidique de l'AChE d'*A. gossypii* présente une nette ressemblance avec celui de la drosophile (notamment la présence d'un peptide hydrophobe en C-terminal, caractéristique des AChEs d'invertébrés (figure 33).

Ces résultats laissent supposer que l'on ait bien identifié le gène codant pour l'AChE chez le puceron *A. gossypii*.

Analyse des séquences du clone TEMR14 de *C. pipiens*:

Comme chez *A. gossypii*, on retrouve certains acides aminés caractéristiques de l'acétylcholinestérase et notamment W121(84) ainsi que la chaîne peptidique 118-127. Cette partie du gène présente 68% d'homologie avec le gène correspondant de la drosophile (figure 32).

L'homologie avec le gène *Ace2* cloné par Colin Malcolm (Malcolm *et al.*, 1998), dont la séquence est notée en annexe PIP.MC, est de **98%**.

Les différences se situent au niveau des positions suivantes (numérotation drosophile):

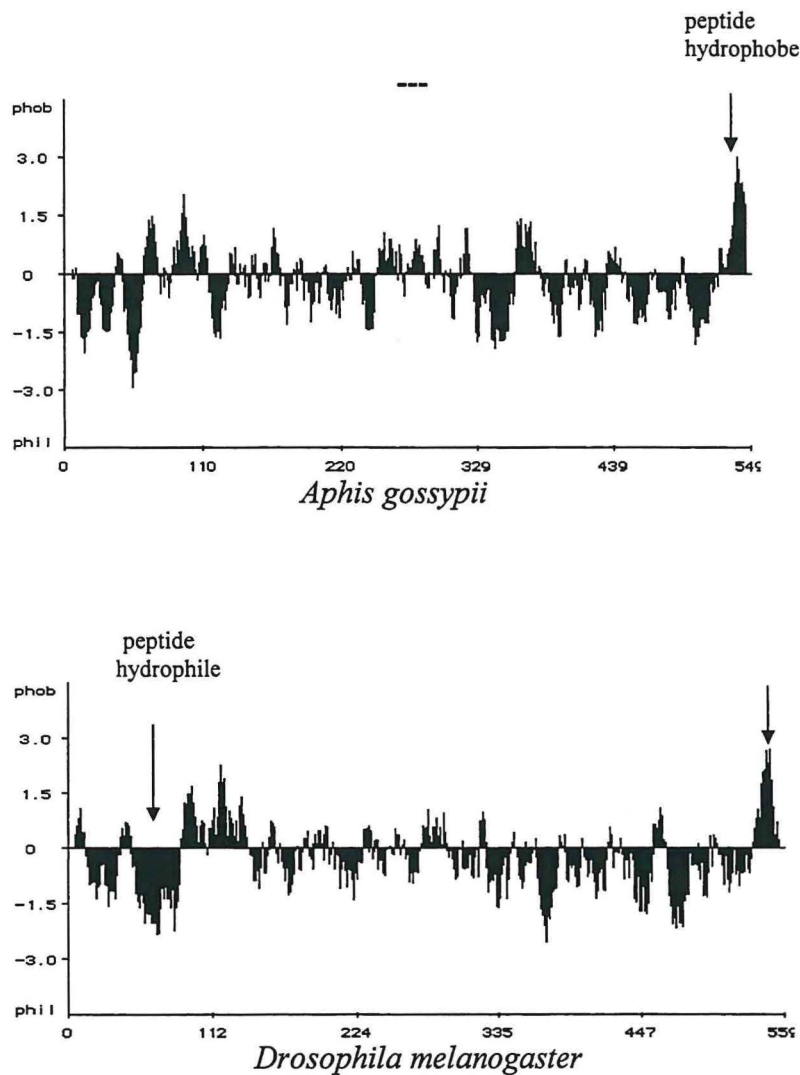
position	TEMR14	PIP.MC
142	I (ATC)	T (ACC)
162	E (GAG)	D (GAT)
262	P (CCG)	A (GCC)
302	P (CCT)	S (TCC)
395	V (GTC)	I (ATC)

L'homologie très forte de TEMR14 avec le gène *Ace2* (qui provient de la souche résistante MSE) suggère que le gène cloné correspondrait au gène *Ace2*, non impliqué dans la résistance. Mais le gène recherché (*Ace1*) pourrait être très proche de *Ace2*. L'identification des mutations dans les souches résistantes est dans ce cas le critère pour distinguer les deux gènes.

Figure 32: Comparaison de la séquence peptidique déduite du gène de l'AChE chez *A. gossypii* (Ag) (clones AgR48 + AgR1 + AgR11), *C. pipiens* (Cp) (clone TEMR14) et *D. melanogaster* (Dm). * : acides aminés (a.a.) communs chez les 3 insectes ; + : a.a. communs à Ag et Dm ; x : a.a. communs à Cp et Dm.. Les a.a. caractéristiques de l'AChE sont en caractères gras (au dessus est mentionnée leur position chez la drosophile).

Ag							
Cp							
Dm	MAISCRQSRV	LPMSLPLPLT	IPLPLVLVL	LHLSGVCVGI	DRLVVQTSSG	PVRGRSVTVQ	GREVHVYVTGI
Ag			104		121	131	
Cp			WTGVLNATRL	PNTCYQERYE	YFPGFVGEEM	WDPNTKLS	ED CLYLNIWI
Dm	PYAKPPVEDL	RFRKPVPAEP	WHGVLDATRL	SATCVQERYE	YFPGFSGEEI	WNPNTN	VSED CLYLNIWVPT
			+ + + + +	+ + + + + + +	+ + + + + + + + +	+ + + + + + + + +	+ + + + + + + + +
Ag	KQRTTHHSNNA	HHAKI	-----P		VLVWIYGGGY	MSGTSTLDIY	DGDLLAATFD
Cp	KIRLRHGRGL	NFGNNDY-FQ	DEDFQRQHQ	SK----	GGLA	MLVWIYGGGF	MSGTSTLDVY
Dm	KARLRHGRGA	NGGEHPNGKQ	ADTDHLIHNG	NPQNTTNGLP	ILIWIYGGGF	MTGSATLDIY	NADIMA
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ag	VMIASMQYRL	GAFGSLYLTP	ELPED-SDDA	PGNMGLWDQA	LAIKWIKENA	AAFGAEPETI	TLFDESAGGG
Cp	VIVASMQYRV	GAFGFFYLSP	YLN-GREGEA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKENA	KPFGGDPDLI	TLFGESAGGS
Dm	VIVASFQYRV	GAFGFLHLAP	EMPSEFAEEA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKDNA	HAFGGNPEWM	TLFGESAGSS
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ag	SVSVHLISPE	TRGMVKRGII	QSGTVNAPWS	YMTGERAVEI	AKKLLDDCNC	NSTSLDSNPI	GTMSMCRSVD
Cp	SVSLHLLSPA	TRGLSHRGIL	QPGTLNAPWS	HMTAEKALSV	AESLIDDCNC	NVTLLKDSPG	SVMHCMRNVD
Dm	SVNAQLMSPV	TRGLVKRGM	QSGTMNAPWS	HMTSEKAVEI	GKALINDCNC	NASMLKTNPA	HVMSCMRSD
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ag	ASTISKQWN	SYSGILGFPS	APTVDGILLP	EHPLDMLAKA	NFSNIDILLG	SNLNEGTYFL	LYDFVDFDR
Cp	AKTISVQWN	SYSGILGFPS	APTIDGVFMT	ADPMTMLREA	NLEGVDILVG	SNRDEGTFL	LYDFIDYFEK
Dm	AKTISVQWN	SYSGILGFPS	APTIDGAFPL	ADPMTMLKTA	DLKDYDILMG	NVRDEGTFL	LYDFIDYFDK
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Ag	TSATALPREK	FVQIVNVIFK	DRTQLERDAI	IYQYSGWEKK	EVDDIYSNOK	QLSDVVADYF	FVCPTNLFAN
Cp	DAATSLPRDK	FLEIMNTIFS	KASEPEREAI	IFQYTGWES-	G-NDGYQNQQ	QVGRAVDHF	FICPTNEFAL
Dm	DDATALPRDK	YLEIMNNIFG	KATQAEREAI	IFQYTSWE--	G-NPGYQNQQ	QIGRAVDHF	FTCPTNEYAQ
	x * * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *
Ag	IVSSRGARVY	YYYFTHRTDS	HLWGDWMGV	HGDEMQYVFG	HPLNMSMPYN	ARERDLSIRI	MEAFTRFSLT
Cp	GLTEQGASVH	YYYFTHRTST	SK				
Dm	ALAERGASVH	YYYFTHRTST	SLWGEWMGV	HGDEIEYFFG	QPLNNSLQYR	PVERELGKRM	LSAVIEFAKT
	x * * * * *	* * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *	x * * * *
Ag	GTPVSDIDW	PLYNESKPIY	HVWNAEMHV	---GYGPRAA	ECQFRNGFFP	KIAQALKETS	KTTCEDYPDS
Cp							
Dm	GNPAQDGEW	PNFSKEDPVY	YIFSTDD-KI	EKLARGPLAA	RCSFWNDYLP	KVRSWA----	GT-C-D-GDS
	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
Ag	MPTINENCTF	TSSFATVNPQ	ISFTIIFIFV	LPAYGLF			
Cp							
Dm	GSASISPRLQ	LLGIAALIYI	CAALRTKRVF				

Figure 33 : Profils d'hydropathie de l'AChE chez *A. gossypii* et *D. melanogaster*.
(0 correspond au premier acide aminé identifié chez *A. gossypii*)



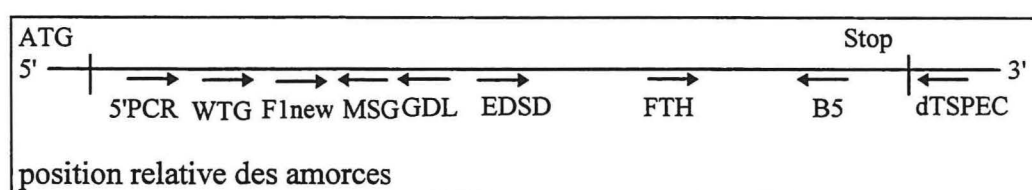
Comparaison de clones résistants et sensibles:

Afin d'identifier les mutations susceptibles d'être impliquées dans la résistance, les séquences de clones résistants et sensibles, pour chacune des espèces, ont été comparées. Ces clones ont été obtenus par PCR. Les amorces ont été:

- les amorces F1new et B5
- les amorces spécifiques du gène cloné: WTG, GDL, MSG, FTH, EDSD pour *A. gossypii* et NTN et PER pour *C. pipiens*.

Les clones obtenus:

Les clones obtenus sont détaillés dans les tableaux 5 et 6 ci-après. Il faut remarquer que certains clones n'ont pas été séquencés complètement. En effet, ne pouvant lire qu'en moyenne 200 bases à chaque séquençage, il a fallu effectuer plusieurs séquençages successifs avec des amorces différentes. Mais certaines séquences n'ont pas été lisibles.

Tableau 5 : clones d'ADNc d'*Aphis gossypii* (larves et nymphes)

a : souche résistante :

NOM	amorces	taille insert (pb)	ADNc (*)	amplification (**)	% séquencé
AgR8	EDSD-B5	858	a		83
AgR18	WTG-GDL	282	a		85
AgR14	WTG-B5	1275	b		18
AgR35	F1new-B5	1143	b	1	32
AgR58	F1new-B5	1143			32
AgR71	F1new-B5	1143			32
AgR3	F1new-B5	1143	b	1	38
AgR 71	F1new-B5	1143			37
AgR12	FTH-dTSPEC	576			34
AgR15	FTH-dTSPEC	537			29
Ag R2	5'PCR-MSG	204			59
AgR10	5'PCR-MSG	216			43

(*) : les clones ayant les mêmes lettres proviennent d'un même ADNc

(**) : les clones ayant les mêmes chiffres proviennent d'une même amplification

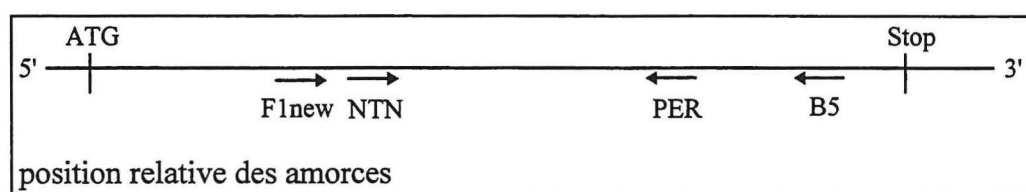
b : souche sensible :

NOM	amorces	taille insert (pb)	ADNc (*)	amplification (**)	% séquencé
AgSN10	WTG-GDL	282	a		85
Ag SN6	WTG-B5	1275	a		18
Ag SN3	EDSD-B5	858	b	1	90
Ag SN4	EDSD-B5	858	b		30
Ag SN5	EDSD-B5	858	b	1	12
Ag SN7	EDSD-B5	858	b		12
Ag SN9	EDSD-B5	858	b	1	53
Ag SN16	F1new-B5	1143	a	2	65
Ag SN18	F1new-B5	1143	a	2	65

(*) : les clones ayant les mêmes lettres proviennent d'un même ADNc

(**) : les clones ayant les mêmes chiffres proviennent d'une même amplification

Tableau 6 : clones d'ADNc de *Culex pipiens*



souche résistante (TC) :

NOM	amorces	taille insert (pb)	stade insecte	ADN c (*)	amplification (**)	% séquencé
TC3	NTN-PER	966	adultes	a	1	65
TC5	NTN-PER	966	adultes	a	1	54
TC11	NTN-PER	966	adultes	a	1	100
TC4	NTN-PER	966	nymphes	b		51
TC10	NTN-PER	966	nymphes	b		61

(*) : les clones ayant les mêmes lettres proviennent d'un même ADNc

(**) : les clones ayant les mêmes chiffres proviennent d'une même amplification

Analyse des mutations:

Les séquences nucléotidiques de chacun des clones se trouvent en annexe 2 et 3. Les tableaux 7 et 8 résument les différences observées entre les clones. Les clones AgR48, AgR1, AgR11 et TEMR14 ont été inclus dans ces tableaux.

Chez *A. gossypii* comme chez *C. pipiens*, on constate un nombre élevé de mutations en acides aminés dans les clones de souches résistantes. Dans ces clones, une mutation n'a pas été observée deux fois dans deux clones différents (sauf S302 chez *C. pipiens* trouvés dans deux clones).

Chez *C. pipiens*, trois mutations (G238, P262, D266) ont été trouvées à la fois dans les souches résistantes et la souche sensible.

Le nombre élevé des mutations en acides aminés peut être le résultat d'artéfacts liés à des erreurs de lecture des séquences. Des erreurs de la transcriptase reverse ou de la *Taq* polymérase sont aussi possibles. Mais la présence de mutations sur la troisième base écarterait l'hypothèse d'erreurs systématiques par les enzymes ou liées à l'expérimentation (erreurs de lecture des séquences par exemple).

Dans aucun des clones n'ont été retrouvées les mutations connues chez les insectes pour être impliquées dans la résistance aux insecticides: F115S, I199V/T, V220L, G303A, S313G, F368Y, G406A.

D'autre part, la majorité des mutations, en raison de leur position par rapport au site actif (figures 34 et 35) et par rapport aux mutations connues de résistance, ne semblent pas pouvoir être impliquées dans la résistance. Seule, la mutation G274D, en raison de sa proximité avec la sérine catalytique 276 pourrait être impliquée dans la résistance. Cette mutation a été introduite par mutagenèse dirigée dans l'AChE de drosophile et il a été observé que l'enzyme ainsi modifiée n'avait pas d'activité enzymatique, ce qui incite à penser que cette mutation n'existe pas.

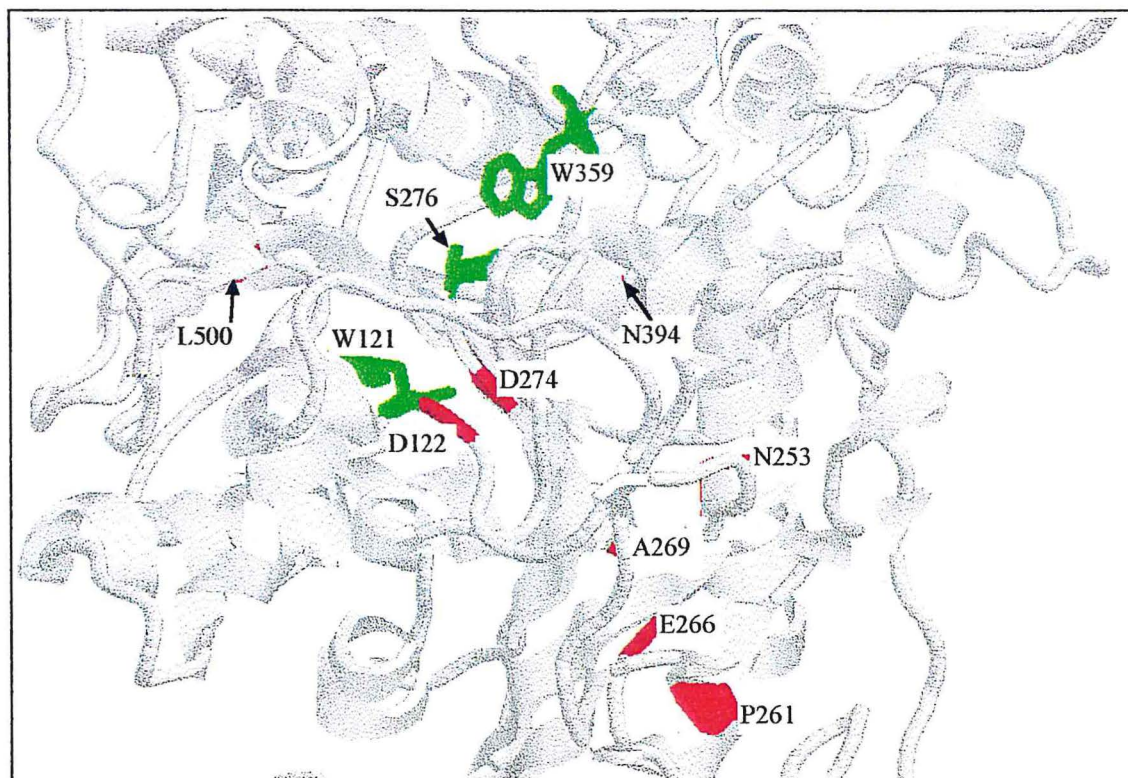


Figure 34: mutations trouvées chez *A. gossypii* (en rouge). En vert, S276 au fond de la gorge du site actif, W359 et W121 à l'entrée de la gorge.

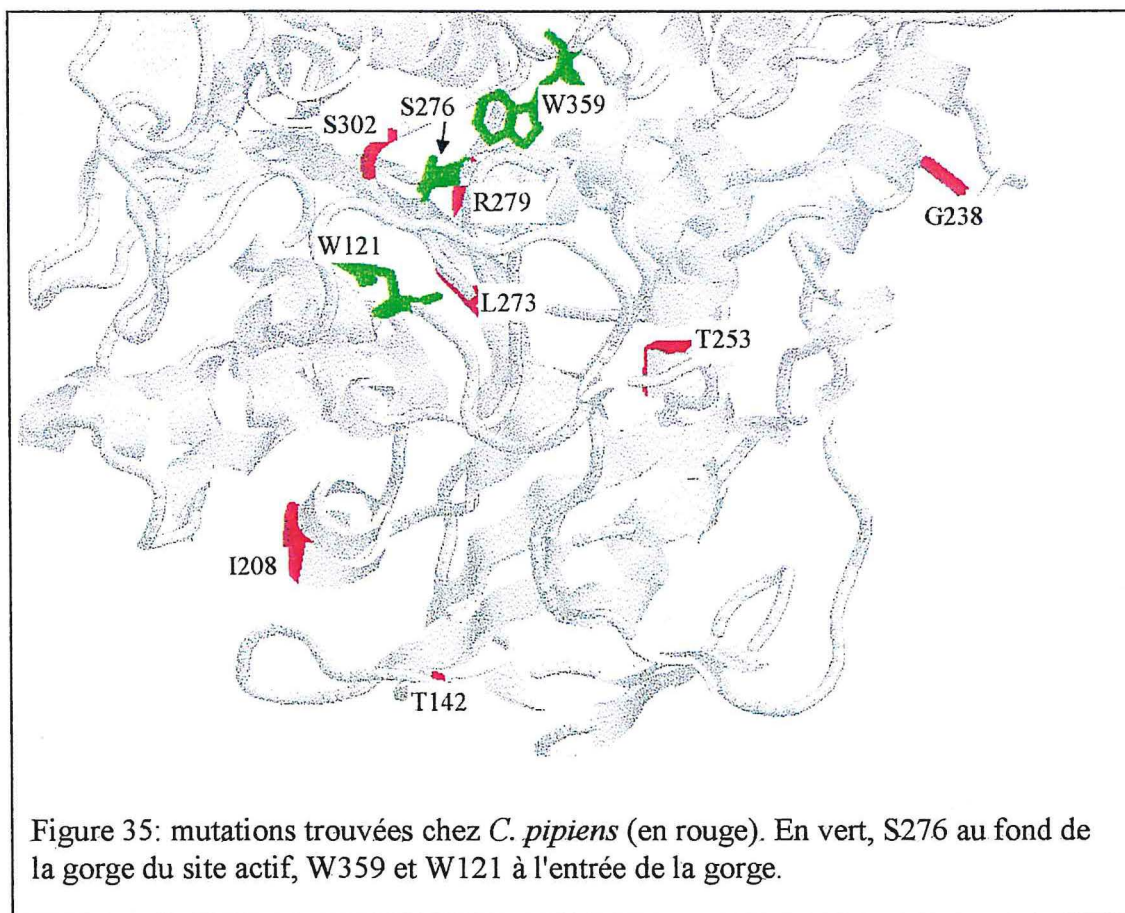


Tableau 7: mutations observées dans les clones de cDNA d'*Aphis gossypii*:

N°DROSO.:	122	242	252	253	261	266	269	274	377	394
AgR1		G GGA	A GCT	I ATC	A GCA	E GAA	T ACA	D GAT	I ATT	N AAT
AgR8				I ATC	P CCA	D GAT	T ACA	G GGT	I ATT	D GAT
AgR48	D GAC									
AgR18	N AAC									
AgR14	N AAC									
AgR35			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgR58			A GCT	N AAC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgR7			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	A GCA	G GGT		
AgR3			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT	T ACT	D GAT
AgR71			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT	I ATT	D GAT
AgSN10	N AAC									
AgSN6	N AAC									
Ag SN3									I ATT	D GAT
AgSN4		G GGA	A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgSN5		G GGC	A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgSN7		G GGC	A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgSN9		G GGC	A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT		
AgSN16			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	D ACA	G GGT	I ATT	D GAT
AgSN18			A GCT	I ATC	A GCA	D GAT	T ACA	G GGT	I ATT	D GAT
N°DROSO:	406	432	490	500						
AgR1	G GGC	V GTA	S TCC	F TTC						
AgR8	G GGA	V GTI	S TCC	F TTC						
AgSN3	G GGC	V GTA	S TCA	L CTC						
AgSN16	G GGA		S TCA	F TTC						
AgSN18	G GGA		S TCA	F TTC						
AgR3	G GGA		S TCC	F TTC						
AgR71	G GGA		S TCC	F TTC						

Tableau 8: mutations observées dans les clones de cDNA de *Culex pipiens*:

N°DROSO:	141	142	146	156	162	197	208	220	238	242
TC3	K AAG	I ATC	H CAT	D GAT	E GAG	L CTG	V GTT	V GTA	E GAG	G GGT
TC5	K AAG	I ATC	H CAT	D GAT	E GAG	L CTG	V GTT	V GT <u>G</u>	G GGG	G GGT
TC11	K AAG	I ATC	H CAT	D GAT	E GAG	L CTG	V GTT	V GTA	E GAA	G GGT
TC10	K AAA	T ACC	H CAC	D GAC	D GAT	L TTG	I ATT	V GT <u>G</u>	E GAG	G GG <u>C</u>
TEMR14	K AAG	I ATC	H CAT	D GAT	E GAG	L CTG	V GTT	V GTA	G GGG	G GGT
N°DROSO:	253	262	266	273	278	279	300	301	302	307
TC3	I ATT	A GCC	G GGT	F TTT	G GGA	R CGG	L CTG	Q CAA	P CCT	A GCA
TC5	I ATT	A GCC	D GAT	F TTT	G GGA					
TC11	T ACT	P CCG	D GAT	L CTT	G GGG	G GGC	L CTG	Q CAA	P CCT	A GCA
TC4							L TTG	Q CAG	S TCC	A GCG
TC10	I ATC	A GCC	D GAT		G GGG	G GGC	L TTG	Q CAG	S TCC	A GCG
TEMR14	I ATT	P CCG	D GAT	F TTT	G GGG	G GGC	L CTG	Q CAA	P CCT	A GCA
N°DROSO:	310	318	324	344	376	378	387	395	397	
TC3	S AGC	L CTG	L CTA							
TC11	S AGC	L CTG	L CTA	H CAI	G GGI	F TTI	L ITG	V GTC	I ATC	
TC4	S AGI	L CTA	L CTC	H CAC	G GGC	F TTC	L CTG	I ATC	I ATT	
TC10	S AGC	L CTA	L CTC							
TEMR14	S AGC	L CTG	L CTA	H CAI	G GGI	F TTI	L ITG	V GTC	I ATT	

Conclusion:

La stratégie d'amplification par PCR d'ADN complémentaire impliquant des amorces dégénérées élaborées à partir des séquences peptidiques conservées du gène codant pour l'AChE de vertébrés et d'invertébrés a permis de cloner chez le puceron *Aphis gossypii* et le moustique *Culex pipiens* un gène qui présente toutes les caractéristiques d'un gène codant pour l'AChE.

Le nombre élevé et l'hétérogénéité des mutations dans les clones obtenus chez les souches résistantes semblent peu compatibles avec la notion de résistance par pression de sélection insecticide où l'on s'attend plutôt à avoir peu de mutations ainsi qu'une faible variabilité entre les clones d'une même souche résistante sélectionnée.

Cette variabilité dans les clones fait penser à un polymorphisme allélique d'un gène non soumis à pression de sélection et donc non impliqué dans la résistance. Ce gène coderait pour une AChE proche de l'enzyme impliquée dans la résistance mais qui ne serait pas synaptique. L'hypothèse de l'existence d'un gène proche a été émise par Baxter et Barker (1998) ainsi que par Hernandez *et al.* (1999) à la suite de la constatation de l'absence de mutations de l'AChE dans des souches résistantes du tique (acarien) *Boophilus microplus*. Chez le moustique *Anopheles albimanus* (Hall, non publié), aucune différence n'aurait été trouvée entre une séquence d'un gène codant pour une AChE d'une souche résistante et celle d'une souche sensible, ce qui conforterait l'idée de l'existence d'un gène proche du gène codant pour l'AChE synaptique.

Ainsi chez le tique *Boophilus microplus* et le moustique *Anopheles albimanus*, le gène codant pour l'AChE synaptique resterait à identifier.

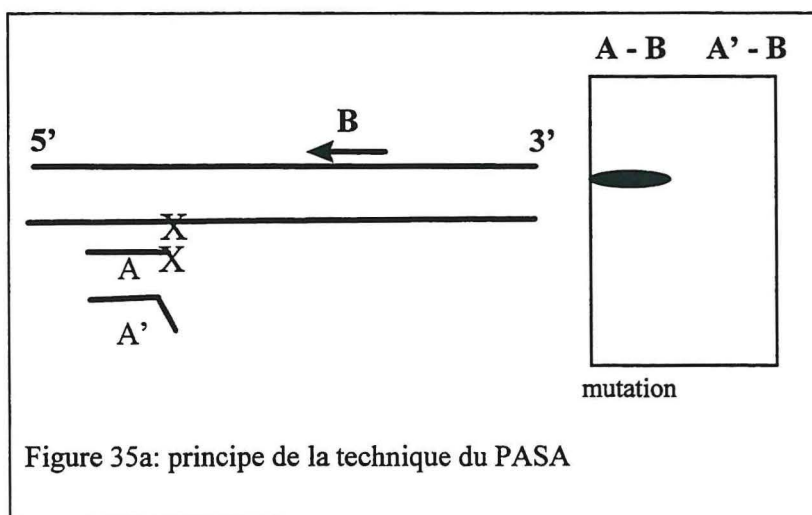
La présence de deux AChE chez *C. pipiens* plaide en faveur de l'existence de deux gènes et le gène cloné, qu'on pourrait appeler alors *Ace2*, coderait pour l'enzyme non synaptique, liée au sexe et non impliquée dans la résistance. Cette enzyme, non vitale pour l'insecte, pourrait tolérer de nombreuses mutations au gré des recombinaisons génétiques. Son rôle est inconnu, mais l'homologie avec les hydrolases à sérine, suggère qu'elle puisse se comporter par exemple comme une estérase non spécifique.

Avec le couples d'amorces F1new - B5, nous retrouvons chez les deux espèces le gène *Ace2*. Dans l'hypothèse où les gènes *Ace1* et *Ace2* sont proches, mais si le gène *Ace2* est surtranscrit par rapport au gène *Ace1*, la probabilité de cloner par PCR le gène *Ace1* est infime avec ce couple d'amorces. Dans ce cas, la stratégie à adopter est donc d'essayer de cloner le gène à partir de l'ADN génomique.

Une autre hypothèse est que ce couple d'amorces est spécifique de *Ace2* chez *A. gossypii* et *C. pipiens* et dans ce cas, il est nécessaire de tester d'autres amorces sur ADNc pour espérer cloner le gène *Ace1* recherché. Une stratégie particulière a été de définir des amorces dont l'extrémité 3' diffère de celle du gène *Ace2*. Ces amorces particulières ont été définies dans le cadre d'une stratégie "ANTI-PASA" décrite dans le chapitre suivant.

4.2.1.2. Clonage à partir d'amorces "anti-pasa "

L'hypothèse d'un gène pouvant avoir une séquence codante très proche de celle du gène cloné a suggéré de tester une technique dérivée de la technique du PASA (PCR amplification of specific alleles) (Sommer *et al.*, 1992). La technique du PASA permet de détecter les changements d'une seule base dans une séquence nucléotidique connue. L'amorce se termine en 3' par la base correspondant à la mutation attendue (figure 35a).



La technique "ANTI-PASA" dérive du PASA mais l'amorce est définie de telle sorte qu'elle ne se termine pas par la base déjà connue. Cette technique a été testée sur *C. pipiens*.

Les amorces utilisées:

Deux amorces B9 et B8 ont été élaborées au niveau de boîtes conservées:

séquence peptidique B9:	W ₁₂₁	N	P	N	T	N	V ₁₂₇	
B9 (sens):	5'	TGG	AAT	CCC	AAC	ACG	AAC	GT (G,T) 3'
gène <i>Ace2 C. pipiens</i> :	5'	TGG	AAT	CCC	AAC	ACG	AAC	GT (<u>A,C</u>) 3'
séquence peptidique B8		G ₄₇₀	R	A	V	G	D	H ₄₇₆
B8 (réverse):	3'	(A,T,G)	GCT	CGT	CAG	CCG	CTA	GTA 5'
gène <i>Ace2 C. pipiens</i> :	3'	<u>C</u>	GCT	CGT	CAG	CCG	CTA	GTA 5'

(en indice: la position correspondante chez la drosophile)

Le couple d'amorces B9 - B8 a été essayé mais aucune amplification n'a été obtenue. Ces amorces ont été combinées aux amorces ayant été utilisées dans la stratégie précédente mais aucune amplification n'a été obtenue.

Conclusion:

Pour expliquer, l'absence d'amplification, on peut émettre l'hypothèse que soit les amorces utilisées n'étaient pas aptes à s'hybrider aussi bien sur *Ace1* que sur *Ace2* soit que les sites "anti-pasa" d'hybridation n'existeraient ni dans *Ace1* ni dans *Ace2*.

Pour augmenter les chances de réussite, Il aurait peut-être fallu combiner les amorces B8 et B9 à d'autres amorces "anti-pasa " ou bien définir d'autres amorces.

En l'absence de résultat avec la stratégie "ANTI-PASA", et l'hypothèse d'avoir cloné un gène surtrancrit ayant été émise, les travaux se sont orientés vers le clonage à partir de l'ADN génomique.

4.2.2. Clonage à partir de l'ADN génomique

Les travaux sur ADN complémentaire ont mis en évidence que le gène cloné *Ace2* n'était pas le gène impliqué dans la résistance aux insecticides mais un gène qui pourrait être proche du gène recherché et sur-transcrit. Les séquences de la partie codante de ces deux gènes peuvent être proches mais la taille et le nombre des introns peut varier d'un gène à l'autre. Cette possible variabilité des introns a été prise en considération dans toutes les stratégies mises en œuvre sur ADN génomique.

Dans un premier temps, des amorces spécifiques du gène *Ace2* cloné chez *A. gossypii* et *C. pipiens* ont été testées non seulement pour retrouver le gène *Ace2* mais surtout pour espérer cloner le gène *Ace1* dont la taille des introns pourrait être différente par rapport à *Ace2*. Seul le gène *Ace2* a été retrouvé chez *C. pipiens* (couple d'amorces *Ace2* de *C. pipiens*: NTN - QSK).

Des amorces dégénérées ont été définies à partir des "boîtes conservées" du gène codant pour l'AChE d'insectes. Nous espérions ainsi cloner les deux gènes *Ace1* et *Ace2*. Seul le gène *Ace2* a été cloné chez *C. pipiens* (couple d'amorces D1S - DIR).

Comme dans le cas des travaux sur ADNc, la stratégie "ANTI-PASA" a été testée sur ADN génomique de *C. pipiens*. Mais aucune amplification n'a été obtenue.

La stratégie suivante a été d'utiliser des amorces (dégénérées ou non) définies dans les boîtes conservées du gène codant pour l'AChE à la fois d'invertébrés et de vertébrés. C'est encore le gène *Ace2* qui a été retrouvé chez *C. pipiens* (couple d'amorces dégénérées F1new - G1new).

L'ultime stratégie pour espérer cloner le gène *Ace1* a été d'utiliser des amorces spécifiques du gène codant pour l'AChE de drosophile. Chez cet insecte, il n'existe qu'un seul gène et celui-ci est impliqué dans la résistance aux insecticides. Il existe peut-être alors des

homologies particulières avec le gène *Ace1* d'*A. gossypii* et de *C. pipiens*. Mais par cette stratégie, ni *Ace2* ni *Ace1* n'ont été retrouvés.

Sur une souche de *C. pipiens* originaire d'Hawaï aux Etats Unis, l'analyse des séquences de l'intron 3 obtenues par Dina Fonseca (Molecular Genetics Laboratory, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Washington) (comm. pers.) a fait apparaître une séquence de 11 nucléotides surnuméraires par rapport aux séquences obtenues chez d'autres souches de cette espèce. Cette séquence de 11 nucléotides pourrait être une caractéristique du gène *Ace1* recherché et donc être un marqueur de la présence de ce gène. Des amorces spécifiques de cette séquence ont été définies et testées sur les souches sensibles et résistantes d'*A. gossypii* et de *C. pipiens*. Cette séquence n'a pas été retrouvée suggérant que cette séquence correspondrait à une insertion spécifique à la souche d'Hawaï.

Toutes ces stratégies ont consisté à cloner des bandes amplifiées par PCR à l'aide de couples d'amorces.

Les amplifications ont été effectuées sur l'ADN génomique extrait soit d'une vingtaine d'individus soit d'un seul individu. En travaillant sur un seul individu, l'objectif était d'identifier les différents allèles.

Le choix des bandes à cloner est une étape clef. Ne connaissant pas la taille ni le nombre d'introns, la taille minimale a été systématiquement prise en compte. Cette taille correspond à la taille de la partie codante correspondante.

Pour ne pas passer à côté d'une bande potentiellement intéressante, les bandes amplifiées ont été clonées directement sans effectuer systématiquement des PCR emboîtées ("nested-PCR") sur chaque bande ni d'hybridations par la technique de Southern. Des essais de PCR emboîtées ont toutefois été effectués mais n'ont rien donné. La taille des introns du gène recherché étant inconnue, il existait un risque pour que la sonde ne puisse s'hybrider dans l'hypothèse d'une taille d'intron trop importante.

Le séquençage des clones a été partiel. En effet, l'important était de retrouver, d'une part l'une ou l'autre des amorces PCR, et d'autre part une séquence codant pour une cholinestérase.

Toutes les stratégies décrites ci-dessus sont détaillées ci-après.

4.2.2.1. Clonage à partir d'amorces spécifiques du gène *Ace2* de *C. pipiens* et d'*A. gossypii* et d'amorces d'insectes définies dans les "boîtes conservées"

Clonage à partir d'amorces spécifiques du gène *Ace2* de *C. pipiens* et d'*A. gossypii*:

Neuf amorces spécifiques du gène cloné *Ace2* ont été utilisées: six d'*A. gossypii* et trois de *C. pipiens* dans l'objectif de retrouver *Ace2* et de cloner *Ace1*. Ces amorces ne sont pas situées dans des zones conservées (figure 36).

Figure 36: position relative des amorces spécifiques du gène *Ace2* codant pour l'AChE d'*Aphis gossypii* et de *C. pipiens*. Les a.a. caractéristiques de l'AChE sont en caractères gras (au-dessus est mentionnée leur position chez la drosophile). Amorces *C. pipiens* en italique. Amorces sens soulignées; amorces reverses non soulignées; les séquences peptidiques correspondantes aux amorces sont soulignées. Ag, Cp et Dm: séquence peptidique respectivement d'*A. gossypii*, *C. pipiens* et *D. melanogaster*. I2 à I5 indiquent la position des introns du gène de l'AChE de drosophile et I3' est un intron supplémentaire chez *C. pipiens*. *: acides aminés conservés entre la drosophile et le poisson torpille *T. californica*.

NTN
LSE

104 121 131

Ag WTGVLNATRL PNTCYQERYE YFPGFVGEEM WDPNTK**LSED** CLYLNWIWPK
Cp YE YFPGFAGEEM WNPNTNVSED CLYLNWVPT
Dm PYAKPPVEDL RFRKPVPAEP WHGVLDATRL SATCVQERYE YFPGFSGEEI WNPNTNVSED CLYINWAPA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

I3
QSK

GDL

Ag KORTHHSNNA HHAKI-----P VLVWIYGGGY MSGTSTLDIY D**GDL**LAATFD
Cp KIRLRHGRGL NFGNNDY-FQ DDEDFQRQH**Q** SK---GGLA MLVWIYGGGF MSGTSTLDVY NAEILAAVGN
Dm KARLRHGRGA NGGEHPNGKQ ADTDHLIHNG NPQNTTNGLP ILIWIYGGGF MTGSATLDIY NADIMAAVGN
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

EDSD **I3'**

276

Ag VMIASMQYRL GAFGSLYLTP EL**PED-SDDA** PGNMGLWDQA LAIKWIKENA AAFGAEPETI TLFDESAGGG
Cp VIVASMQYRV GAFGFFYLSP YLN-GREG**E**A PGNVGLWDQA LAIRWLKENA KPFGGDPDLI TLFGESAGGS
Dm VIVASFQYRV GAFGFLHLAP EMPSEFAEEA PGNVGLWDQA LAIRWLKDNA HAFGPNPEWM TLFGESAGSS
* * * * * * * * * *

SHM
SYM

MVK

I4

345

Ag SVSVHLISPE TRG**MVKRGII** QSGTVNAPWS Y**MTG**EAVEI AKKLDDCNC NSTSLDSNPI GTMSCMRSDV
Cp SVSLHLLSPA TRGLSHRGIL QPGTLNAPWS H**MTA**EKALSV AESLIDDCNC NVTLLKDSPG SVMHCMRNVD
Dm SVNAQLMSPV TRGLVKRGMM QSGTMNAPWS HMTSEKAVEI GKALINDCNC NASMLKTNPA HVMSCMRSDV
* * * * * * * * * *

I5

405

Ag ASTISK**KQWN** SYSGIL**GFPS** APTVDGILLP EHPLDMLAKA NFSNIDILLG SNLNEGTYFL LYDFVDFFDR
Cp AKTISV**QQWN** SYSGIL**GFPS** APTIDGVFMT ADPMTMLREA NLEGVDILVG SNRDEGTYFL LYDFIDYFEK
Dm AKTISV**QQWN** SYSGIL**SFPS** APTIDGAFLP ADPMTLMKTA DLKDYDILMG NVRDEGTYFL LYDLIDYFDK
* * * * * * * * * *

EKF

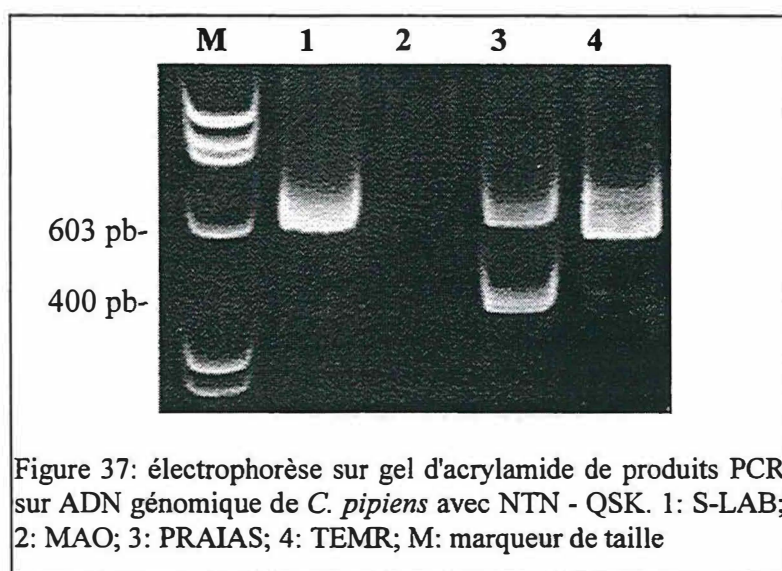
480

Ag TSATAL**PREK** F**VQI**VNVIFK DRTQLERDAI IYQYSGWEKK EVDDIYSNQK QLSDDVVADYF FVCPNTLNFAN
Cp DAATSLPRDK FLEIMNTIFS KASEPEREAI IFQYTGWES- G-NDGYNQQQ QVGRAVGDFH FICPTNEFAL
Dm DDATALPRDK YLEIMNNIFG KATQAEREAI IFQYTSWE-- G-NPGYNQQQ QIGRAVGDFH FTCPTNEYAQ
* * * * * * * * * *

Des amplifications ont été obtenues avec le couple d'amorces NTN-QSK (qui encadre l'intron 3) chez les souches de *C. pipiens* S-LAB, PRAIAS et TEMR (figure 37). Les amorces sont spécifiques du gène cloné *Ace2*. Seul le fragment correspondant à la souche TEMR a été séquencé (clone TEMRCYR1). Il présentait une homologie de 100% avec le gène *Ace2* cloné.

Deux bandes de tailles différentes (respectivement 600 et 400 pb) ont été observées dans la souche de *C. pipiens* PRAIAS. La présence simultanée dans la même réaction PCR de ces deux bandes pouvait en effet indiquer qu'il y avait eu amplification de deux fragments de deux gènes très proches au niveau de la partie codante mais dont la taille de l'intron 3 était différente.

La bande de 400 pb a été séquencée (clone PRAIAS CYR4) mais elle était le résultat d'une amplification du couple d'amorces QSK-QSK de séquence inconnue.



Conclusion:

Le gène *Ace1* n'a pu être identifié par cette stratégie. La raison la plus probable est que ces amorces sont spécifiques du gène *Ace2*. Pour espérer cloner ce gène, des amorces définies dans les zones de conservation entre les différentes espèces d'insectes ont été utilisées.

Clonage à partir d'amorces d'insectes définies dans les "boîtes conservées":

Ces amorces ont été définies, non pas à partir de la séquence peptidique des "boîtes conservées" entre les différents insectes mais de leur séquence nucléotidique (les séquences nucléotidiques ne sont pas disponibles pour tous les insectes dont le gène a été cloné).

Pour s'affranchir du problème lié à l'intron, les couples d'amorces ont été définis de telle sorte qu'ils amplifient soit à l'intérieur d'un exon soit autour de l'intron 3', intron de faible taille (80 pb) chez les moustiques du genre *Culex* et *Anopheles*. La position des introns étant identique chez *A. stephensi*, la drosophile et *C. pipiens* (introns 3 et 4 du gène *Ace2*), on a supposé que la position pouvait être aussi conservée chez *Ace1*.

Les amplifications ont été effectuées sur l'ADN génomique extrait d'un seul individu chez *C. pipiens*. Avec cette stratégie, nous espérons d'une part retrouver le gène *Ace2* et identifier *Ace1* et d'autre part connaître les différents allèles de ces gènes chez un individu.

Les amorces utilisées:

Six amorces ont été élaborées: D1S, D2S, D3S, D1R, D2R, D3R. Leur position relative par rapport à l'alignement des séquences peptidiques chez les insectes de trouve dans la figure 38.

D1S (sens):

seq. peptidique D1S:	W ₁₈₄	I	Y	G	G	G ₁₈₉
seq. nucléotidique:						
<i>A. stephensi</i>	5' TGG	ATC	TAT	GGC	GGT	GGT 3'
<i>L. decemlin.</i>	5' TGG	ATC	TAC	GGT	GGT	GGT 3'
<i>A. gossypii</i> (<i>Ace2</i>)	5' TGG	ATA	TAT	GGT	GGA	GGT 3'
<i>C. pipiens</i> (<i>Ace2</i>)	5' TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG 3'
					A	
<i>D. melanog.</i>	5' TGG	ATC	TAT	GGC	GGT	GGC 3'
D1S:	5' TGG	ATC	TAC	GGC	GGT	GGC 3'
	A	A	T	T	A	
				G		

D1R (reverse):

seq. peptidique D1R:	A ₂₁₄	S F	M	Q	Y	R ₂₁₉
seq. nucléotidique:						
<i>A. stephensi</i>	5' GCG	TCG	ATG	CAG	TAC	CGT 3'
<i>L. decemlin.</i>	5' GCT	TCA	ATG	CAG	TAT	CGT 3'
<i>A. gossypii</i> (Ace2)	5' GCC	TCA	ATG	CAG	TAT	AGG 3'
<i>C. pipiens</i> (Ace2)	5' GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA 3'
<i>D. melanog.</i>	5' GCC	TCC	TTC	CAG	TAT	CGG 3'
D1R:	3' CGC	AGT	TAG	GTC	ATG	GCA 5'
	G	G	A C		A	T C
	A	C				T

D2S (sens):

seq. peptidique D2S:	W ₁₈₄	D	Q	A I	L	A ₁₈₉
seq. nucléotidique:						
<i>A. stephensi</i>	5' TGG	GAT	CAA	GCG	CTC	GCC 3'
<i>L. decemlin.</i>	5' TGG	GAT	CAA	ATT	CTA	GCT 3'
<i>A. gossypii</i> (Ace2)	5' TGG	GAT	CAA	GCG	CTG	GCT 3'
						A
<i>C. pipiens</i> (Ace2)	5' TGG	GAC	CAA	GCG	CTG	GCT 3'
					T	
<i>D. melanog.</i>	5' TGG	GAT	CAG	GCA	CTC	GCC 3'
D2S:	5' TGG	GAT	CAA	GCG	CTG	GCC 3'
		A C	G	ATA	T A	A
				T	C	T

D2R (reverse):

seq. peptidique D2R:	N ₃₀₆	A	P	W	S	Y M	M ₃₁₂
seq. nucléotidique:							
<i>A. stephensi</i>	5' AAC	GCA	CCG	TGG	AGC	CAT	ATG 3'
<i>L. decemlin.</i>	5' AAC	GCT	CCG	TGG	AGC	TAC	ATG 3'
<i>A. gossypii</i> (Ace2)	5' AAC	GCA	CCT	TGG	AGC	TAC	ATG 3'
<i>C. pipiens</i> (Ace2)	5' AAC	GCA	CCC	TGG	AGC	CAC	ATG 3'
		G			T		
<i>D. melanog.</i>	5' AAC	GCC	CCC	TGG	AGC	CAC	ATG 3'
D2R:	3' TTG	CGA	GGG	ACC	TCG	GTG	TAC 5'
		G	C		A	A A	
		C	A				
		T					

D3S (sens):

seq. peptidique D3S:	M ₃₄₅	R	S A N Q	V	D	A ₃₅₀
seq. nucléotidique:						
<i>A. stephensi</i>	5' ATG	CGA	AAC	GTG	GAC	GCA 3'
<i>L. decemlin.</i>	5' ATG	AGA	GCA	GTG	GAT	GCT 3'
<i>A. gossypii</i> (Ace2)	5' ATG	CGT	TCT	GTT	GAC	GCA 3'
<i>C. pipiens</i> (Ace2)	5' ATG	CGA	AAC	GTG	GAC	GCA 3'
<i>D. melanog.</i>	5' ATG	CGT	TCC	GTG	GAC	GCC 3'
D3S:	5' ATG	CGA	AAA	GTG	GAC	GCC 3'
		A T	GCC	T	T	A
			T T			T

D3R (reverse):

seq. peptidique D3R:	G ₄₀₀	S	N	H	D	E ₄₀₅	
		N	V	R	N		
				L			
				K			
seq. nucléotidique:							
<i>A. stephensi</i>	5'	GGT	AGC	AAC	CGG	GAC	GAA GT 3'
<i>L. decemlin.</i>	5'	GGG	AGT	AAT	CAC	GAT	GAA GT 3'
<i>A. gossypii</i> (Ace2)	5'	GGA	AGC	AAT	CTG	AAC	GAA GT 3'
<i>C. pipiens</i> (Ace2)	5'	GGA	AGT	AAC	CGT	GAC	GAA GT 3'
<i>D. melanog.</i>	5'	GGA	AAT	GTC	AGG	GAT	GAG GT 3'
D3R:	3'	CCT	TCA	TTA	TTC	TAG	CTT CA 5'
		C	TG	CAG	GAG	C A	C
		A			CA		

Au total, 4 combinaisons d'amorces ont été testées chez *C. pipiens*: D1S - D1R, D1S - D2R, D2S - D2R et D3S - D3R. Les PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique extrait d'un seul individu (par la méthode au CHELEX).

Le couple d'amorces D3S - D3R n'a pas donné d'amplification.

Des résultats positifs ont été obtenus avec le couple d'amorces D1S - D1R.

Figure 38: position relative des amorces D1S, D2S, D3S, D1R, D2R, D3R par rapport à l'alignement des séquences peptidiques d'AChE d'insectes.

(*): a.a. communs à *Aedes aegypti* et *A. stephensi*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Aphis gossypii*, *Culex pipiens* (souche TEMR et séquence de Colin Malcolm); (+): a.a. communs à *Lucilia cuprina*, *Musca domestica* et *Drosophila melanogaster*; (x); a.a. communs à l'ensemble des insectes. I3: intron 3 (drosophile); I3': intron 3' (Culex)

			I3			D1S	
	* *					*****	**** * * *
A.aegypti	KTRLRHGRGL	NFGNNDY-FQ	DDDDFQRQHQ	SK----	GGLA	MLVWIYGGGF	MSGTSTLDVY
A.stephen.	KTRLRHGRGL	NFGSNDY-FQ	DDDDFQRQHQ	SK----	GGLA	MLVWIYGGGF	MSGTSTLDIY
L.decemli.	RLRIRHHADK	PTIDR-----	-----	-----	PKVP	VLIWIYGGGY	MSGTATLDVY
A.gossyp.R	KQRTTHS---	---NNAHHA-	-----	-KI-----	P	VLVWIYGGGY	MSGTSTLDIY
C.pip.Temr	KIRLRHGRGL	NFGNNDY-FQ	DDEDFQRQHQ	SK----	GGLA	MLVWIYGGGF	MSGTSTLDVY
C.pi.MCOLM	KTRLRHGRGL	NFGNNDY-FQ	DDDDFQRQHQ	SK----	GGLA	MLVWIYGGGF	MSGTSTLDVY
L.cuprina	KARLRHGRGA	NGGEHSSKT-	-DPDHLIHS	TPQNTTNGLP		ILIWIYGGGF	MTGSATLDIY
M.domest.R	KARLRHGRGT	NGGEHSSKT-	-DQDHLIHS	TPQNTTNGLP		ILIWIYGGGF	MTGSATLDIY
D.melanog.	KARLRHGRGA	NGGEHPNGKQ	ADTDHLIHNG	NPQNTTNGLP		ILIWIYGGGF	MTGSATLDIY
	+++++++	+++++	+ +++++	+++++++		+++++++	+++++++
	x x					xxxxxxx	x x xxx x
			D1R			I3'	D2S
	***	* *****	* * * *			*** * * *	*** * * *
A.aegypti	NAEMLAAVGN	VIVASMQYRV	GSFGFFYLAP	YLND---	DDA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKENA
A.stephen.	NAEILAAVGN	VIVASMQYRV	GAFGFLYLAP	YINGYEE-DA		PGNMGMDQA	LAIRWLKENA
L.decemli.	DADIIAATSD	VIVASMQYRL	GSFGFLYLNR	YFPRGSDET-		PGNMGLWDQI	LAIRWLKDNA
A.gossyp.R	DGDLAATFD	VIVASMQYRL	GAFGSLYLTP	ELPED-SDDA		PGNMGLWDQA	LAIRWLKENA
C.pip.Temr	NAEILAAVGN	VIVASMQYRV	GAFGFFYLSP	YLN-GREG	EA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKENA
C.pi.MCOLM	NAEILAAVGN	VIVASMQYRV	GAFGFFYLSP	YLN-GREE	EA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKENA
L.cuprina	NADIYSVGNV	S-VASFQYRV	GAFGFLHLSP	VMP-GFEE	EA	PGNVGLWDQA	LALRWLKENA
M.domest.R	NAEIMSAVGN	VIVASFQYRL	GAFGFLHLSP	VMP-GFEE	EA	PGNVGLWDQA	LALRWLKENA
D.melanog.	NADIMAAVGN	VIVASFQYRV	GAFGFLHLSP	EMPSEFA	EA	PGNVGLWDQA	LALRWLKDNA
	++ +	+++++	+++++ +	++ + ++		+++++	++ + ++
		xx xxx	x xx x			xxx x xxx	xx x x xx
			276			D2R	
	** * *	*** *****	* * * *	* * *		* * * *	* * *
A.aegypti	KAFGGDPDLI	TLFGESAGGS	SVSLHLLSPV	TRGLSRRGIL	QSGTLNAPWS	HMSAEKALSV	
A.stephen.	KAFGGDPDLI	TLFGESAGGS	SVSLHLLSPV	TRGLSKRGIL	QSGTLNAPWS	HMTAEKALQI	
L.decemli.	AAFGGDPDLI	TLFGESAGGG	SISIHLLSPV	TKGLVRRGIM	QSGTMNAPWS	YMSGRAEQI	
A.gossyp.R	AAFGAEPETI	TLFDESAGGS	SVSVHLISPE	TRGMVKGRII	QSGTVNAPWS	YMTGERAVEI	
C.pip.Temr	KPFGGDPDLI	TLFGESAGGS	SVSLHLLSPA	TRGLSHRGIL	QPGTLNAPWS	HMTAEKALSV	
C.pi.MCOLM	KAFGGDPDLI	TLFGESAGGS	SVSLHLLSPA	TRGLSHRGIL	QSGTLNAPWS	HMTAEKALSV	
L.cuprina	RAFGGNPEWM	TLFGESAGSS	SVNAQLASPV	TRGLVKGMM	QSGTMNAPWS	HMTSEKAVEI	
M.domest.R	RAFGGNPEWM	TLFGESAGSS	SVNAQLMSPV	TRGLVKGMM	QSATMNAPWS	HMTSEKAVEI	
D.melanog.	HAFGGNPEWM	TLFGESAGSS	SVNAQLMSPV	TRGLVKGMM	QSGTMNAPWS	HMTSEKAVEI	
	+++++++	+++++++	+++++ ++	+++++++	++ +	+++++	+++++
	xx x	xxx xxxx	x x x xx	x x xxxxx	x x		x x

Les clones obtenus:

8 bandes PCR ont été clonées chez *C. pipiens*; 27 clones ont été séquencés partiellement (tableau 9).

Tableau 9 : clones d'ADN génomique de *C. pipiens*; stratégie amorces dégénérées d'insectes

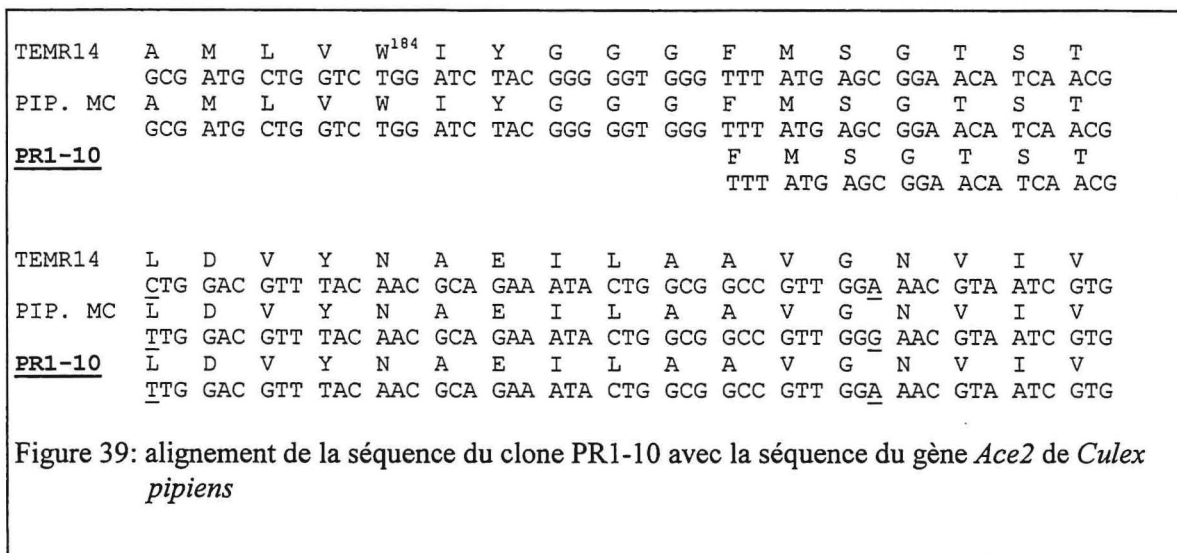
NOM	SOUCHE	amplification (*)	AMORCES	taille attendue	% séquen.	amorce séquencée	résultat séquence
PR1-2	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	41	DIS	inconnue
PR1-5	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	40	DIR	inconnue
PR1-8	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	55	DIS	inconnue
PR1-10	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	100	DIS-DIR	gène <i>Ace2</i>
PR1-13	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	52	DIS	inconnue
PR1-15	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	50	DIS	inconnue
PR1-17	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	29	DIS	inconnue
PR1-18	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	45	DIS	inconnue
PR1-19	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	40	DIS	inconnue
PR1-20	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	40	DIS	inconnue
PR1-21	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	29	DIS	inconnue
PR1-22	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	30	DIS	inconnue
PR1-23	PRAIAS	1	D1S-DIR	105	20	DIR	inconnue
PR5-4	PRAIAS		D1S-DIR	105	39	DIS	inconnue
PR2-1	PRAIAS	2	D1S-D2R	387 + 13'	9	D2R	inconnue
PR2-5	PRAIAS	2	D1S-D2R	387 + 13'	7	D2R	inconnue
PR2-8	PRAIAS	2	D1S-D2R	387 + 13'	8	D2R	inconnue
PR2-11	PRAIAS	2	D1S-D2R	387 + 13'	9	D1S	inconnue
PR6-5	PRAIAS	3	D1S-D2R	387 + 13'	11	D1S	inconnue
PR6-6	PRAIAS	3	D1S-D2R	387 + 13'	13	D2R	inconnue
PR6-7	PRAIAS	3	D1S-D2R	387 + 13'	10	D1S	inconnue
GAR2-11	GARA		D1S-D2R	387 + 13'	26	D1S	inconnue
PR3-4	PRAIAS	4	D2S-D2R	198	25	D2R	inconnue
PR3-7	PRAIAS	4	D2S-D2R	198	24	D2R	inconnue
PAD15-4	PADOVA	5	D2S-D2R	198	18	D2R	inconnue
PAD15-6	PADOVA	5	D2S-D2R	198	20	D2R	inconnue
PAD15-9	PADOVA	5	D2S-D2R	198	16	D2R	inconnue

(*) : les clones ayant les mêmes chiffres proviennent d'une même amplification

Conclusion:

Avec l'utilisation d'amorces dégénérées spécifiques d'insectes et élaborés à partir de boîtes conservées, seul un clone (PR1-10) a donné une séquence correspondant à un gène

codant pour une cholinestérase. L'alignement de cette séquence avec celle du gène *Ace2* de *C. pipiens* montre un pourcentage d'homologie de 100% du clone PR1-10 avec *Ace2* (figure 39).



Le clone PR1-10 homologue des clones correspondant au gène *Ace2* nous a amené à émettre l'hypothèse que ce clone correspondrait au gène *Ace2* déjà identifié, ce qui laisse supposer que les amorces D1S - D1R seraient spécifiques de ce gène non impliqué dans la résistance. On peut aussi émettre l'hypothèse que l'homologie de *Ace2* avec *Ace1* soit totale dans cette région du gène et dans ce cas, rien ne nous permet de discriminer les deux gènes.

4.2.2.2. Clonage à partir d'amorces "anti-pasa "

L'hypothèse d'un gène pouvant avoir une séquence codante très proche de celle du gène connu nous a suggéré de tester la technique "ANTI-PASA" comme dans le cas des travaux sur ADNc.

Cette technique a été testée sur *C. pipiens*.

Les amorces utilisées:

Les amorces "anti-pasa" sont les mêmes amorces que celles utilisées sur ADNc. Il s'agit des amorces B9 et B8 définies au niveau de boîtes conservées dont la séquence est la suivante:

séquence peptidique B9:	W ₁₂₁	N	P	N	T	N	V ₁₂₇	
B9 (sens):	5'	TGG	AAT	CCC	AAC	ACG	AAC	GT (<u>G,T</u>) 3'
gène <i>Ace2 C. pipiens</i> :	5'	TGG	AAT	CCC	AAC	ACG	AAC	GT (<u>A,C</u>) 3'

séquence peptidique B8	G ₄₇₀	R	A	V	G	D	H ₄₇₆	
B8 (réverse):	3'	(<u>A,T,G</u>)	GCT	CGT	CAG	CCG	CTA	GTA 5'
gène <i>Ace2 C. pipiens</i> :	3'	<u>C</u>	GCT	CGT	CAG	CCG	CTA	GTA 5'

(en indice: la position correspondante chez la drosophile)

Ces amorces ont été combinées à différentes amorces dégénérées définies dans les zones conservées d'insectes et de vertébrés. Aucune amplification n'a été obtenue.

Conclusion:

Pour expliquer, l'absence d'amplification, on peut émettre l'hypothèse que soit les amorces utilisées n'étaient pas aptes à s'hybrider aussi bien sur *Ace1* que sur *Ace2* soit que les sites "anti-pasa" d'hybridation n'existeraient ni dans *Ace1* ni dans *Ace2*.

4.2.2.3. Clonage à partir d'amorces de vertébrés et d'invertébrés définies dans les "boîtes conservées"

Les amorces spécifiques du gène *Ace2* et celles définies dans les zones de conservation chez les insectes ne permettant de ne retrouver que le gène *Ace2*, la stratégie suivante a été d'utiliser des amorces définies à partir des "boîtes conservées" d'invertébrés et de vertébrés.

Les amorces utilisées:

Certaines de ces amorces sont celles ayant été utilisées pour cloner le gène sur ADNc:

- amorces non dégénérées: B1, B3, B4, B5, B6
- amorces dégénérées: F1new, G1new, TLFGEREV, F2sens

D'autres amorces ont été élaborées. Il s'agit de six amorces (C1 à C6). Elles ont été définies à partir des boîtes les plus conservées du gène codant pour l'AChE chez les invertébrés (drosophile) et chez les vertébrés: poissons torpilles (*Torpedo californica* et *T. marmorata*), souris, rat, boeuf, homme et poulet, après alignement des séquences peptidiques grâce à la base de données ESTHER.

Les séquences nucléotidiques des amorces ont été déduites selon les recommandations de Lathe (1985) quant au choix de la troisième base du codon.

La position relative des amorces C1 à C6 se trouve dans la figure 40. Les amorces C1 et C3 sont détaillées ci-après à titre d'exemple:

C1 (sens): 5' GAG GGC ACA GAG ATG TGG AAC CC 3'
TCT TCT

seq. pept.	121						
C1	E	G	T	E	I	W	N
	S		S				
Droso	S	G	E	E	I	W	N
Tcalif	S	G	S	E	M	W	N
Tmarmor	P	G	S	E	M	W	N
Mouse	E	G	T	E	M	W	N
Rat	E	G	T	E	M	W	N
Fbs	E	G	T	E	M	W	N
Human	E	G	T	E	M	W	N
Chicken	Q	G	S	E	M	W	N
		*		*		*	*

C3 (sens): 5' GCC GGC GAG GGC CGG CGG CGG GC 3'
TG CT C

seq. pept.							
C3	A/V	G/A	E	G/A	R	R	R
Droso	S	E	K	A	V	E	I
Tcalif	V	A	E	G	R	R	R
Tmarmor	V	A	E	G	R	R	R
Mouse	A	G	E	A	R	R	R
Rat	A	G	E	A	R	R	R
Fbs	V	G	E	A	R	R	R
Human	M	G	E	A	R	R	R
Chicken	A	A	E	G	R	R	R

*: acides aminés conservés entre toutes ces espèces

F1new **B2** **I3** **G1new** **C2**

Drosophila SGEEIWNPNP...NTNVED CLYINNVWAPA KA(-38)RLR HGI..LIWIY GGGFMTGSA...TLDIY NADIMAAYGN VIVASFQYRV
Tcalif SGSEMMWNP...NREMSD CLYLINIWVPS P.....RPK STT.VMWIY GGGFYSGSS...TLDVY NGKYLAYTEE VVLVLSLYRV
Tmarmor PGSEMMWNP...NREMSD CLYLINIWVPS P.....RPK SAT.VHLWIY GGGFYSGSS...TLDVY NGKYLAYTEE VVLVLSLYRV
Mouse EGTEMMWNP...NRELED CLYLNIVWTPY P.....RPA SPTPLVIWIY GGGFYSGAA...SLDVY DGRFLAQVEG AVLVSMNYRV
Rat EGTEMMWNP...NRELED CLYLNIVWTPY P.....RPT SPTPLVIWIY GGGFYSGAS...SLDVY DGRFLAQVEG TVLVSMNYRV
Fbs EGTEMMWNP...NRELED CLYLNIVWTPY P.....RPS SPTPLVLIWIY GGGFYSGAS...SLDVY DGRFLVQAEV TVLVSMNYRV
Human EGTEMMWNP...NRELED CLYLNIVWTPY P.....RPT SPTPLVLIWIY GGGFYSGAS...SLDVY DGRFLVQAEV TVLVSMNYRV
Chicken QGSEMMWNP...NREMSD CLYLNIVWTPY G.....DPT EP.PVLVWIY GGGFYSGSV...SLDVY DGRYLAAEE AVLVSMNYRV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

B4 **B3** **I3'** **TLFGEREV** **F2sens**

Drosophila GAFGLFLHAP EMPSEFAEEA PGNVGLWDQA LAIRWLKDNA HAFGGNPEWM TLFGESAGSS SVNAQLMSPV...T..RG..L VKRGMMSQST
Tcalif GAFGLFLALHG.....SQEA PGNVGLLDQR MALQWVHDNI QFFGGDPKTV TLFGESAGGA SVGMHILSPG...S..RD..L FRRAILQSGS
Tmarmor GAFGLFLALHG.....SQEA PGNMGLLDQR MALQWVHDNI QFFGGDPKTV TLFGESAGGA SVGMHILSPG...S..RD..L FRRAILQSGS
Mouse GTFFGLALPG.....SREA PGNVGLLDQR LAIQWVQENI AAFGGDPMVS TLFGESAGAA SVGMHILSLP...S..RS..L FHRVQLQSGT
Rat GTFFGLALPG.....SREA PGNVGLLDQR LAIQWVQENI AAFGGDPMVS TLFGESAGAA SVGMHILSLP...S..RS..L FHRVQLQSGT
Fbs GAFGLALPG.....SREA PGNVGLLDQR LAIQWVQENV AAFGGDPTSV TLFGESAGAA SVGMHLLSPP...S..RG..L FHRVQLQSGA
Human GAFGLALPG.....SREA PGNVGLLDQR LAIQWVQENV AAFGGDPTSV TLFGESAGAA SVGMHLLSPP...S..RG..L FHRVQLQSGA
Chicken GSLGFLALAG.....HRDA PGNVGLWDQA LAIQWVRDNI EAFGGDPDLI TLFGESAGAA SVGFHLLSPH...S..KG..L FRRVQLQSGS
* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C4 **C3** **I4** **I5** **C5** **I6**

Drosophila MNAPWSHMTS EKAVE.IGKA LINDNCNCS MLKTNPAHVM SCMRSVDAKT ISVQWV..S YSGILSP...SAP...TIDGAFPL
Tcalif PNCWPASVSV AEGRR.RAVE LGRNLNCLN S...DEELI HCLREKKPQE LIDVENVVLP FDSIFRFS...FVP...VIDGEFFP
Tmarmor PNCWPASVSV AEGRR.RAVE LGRNLNCLN S...DEELI QCLREKKPQE LIDVENVVLP FDSIFRFS...FVP...VIDGEFFP
Mouse PNGPWATVSA GEARR.RATL LARLVGCPG GAGGNDTELI ACLRTRPAQD LVDHEHWVLP QESIFRFS...FVP...VVDGDFLS
Rat PNGPWATVSA GEARR.RATL LARLVGCPG GAGGNDTELI ACLRTRPAQD LVDHEHWVLP QESIFRFS...FVP...VVDGDFLS
Fbs PNGPWATVGV GEARR.RATL LARLVGCPG GAGGNDTELI ACLRTRPAQD LVDHEHWVLP QEHVFRFS...FVP...VVDGDFLS
Human PNGPWATVGM GEARR.RATQ LARLVGCPG GTGGNDTELV ACCLTRPAQV LVNHEHWVLP QSVFRFS...FVP...VVDGDFLS
Chicken PNGPWATIGA AEGRR.RAAA LGRAVGCPYG...NETEFL GCLRGKEAAD VLEGEVGVMP PQSVFRFA...FVP...VVDGDFV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

I5 **C5** **I6**

Drosophila ADPMTLM...KTADL...KDYD ILMGNVRDEG TYFLLYDFID YFDKDDATAL PRDKYLEIMN NIFGKATQAE REAIFQYTS
Tcalif TSLESML...NSGNF...KKTQ ILLGVNKDEG SFLLLYGAPG FSKDNESKI SREDFMSGVK LSVPHANDLG LDVLTQYTD
Tmarmor TSLESML...NAGNF...KKTQ ILLGVNKDEG SFLLLYGAPG FSKDNESKI SREDFMSGVK LSVPHANDLG LDVLTQYTD
Mouse DTPDALI...NTGDF...QDLQ VLVGVVDEG SYFLVYGVPG FSKDNESLI SRAQFLAGVR IGVPQASDLA AEAVVLHYTD
Rat DTPDALI...NTGDF...QDLQ VLVGVVDEG SYFLVYGVPG FSKDNESLI SRAQFLAGVR IGVPQASDLA AEAVVLHYTD
Fbs DTPDALI...NAGDF...VGLQ VLVGVVDEG SYFLVYGVPG FSKDNESLI SRAQFLAGVR IGVPQASDLA AEAVVLHYTD
Human DTPDALI...NAGDF...HGLQ VLVGVVDEG SYFLVYGVPG FSKDNESLI SRAEFLAGVR VGVFQVSDLA AEAVVLHYTD
Chicken DSPDVAL (-47) GDGGY (-114) HRAGGEVE VLLGAVRVEG SYFLVYGVPG FSKDNESLI SREEFLGVR MGVPQATELA AEAVVLHYTD
* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

I7 **B5** **C6**

Drosophila WE.G.NPGYQ NO.....QQIGRA VGDHFFTCPT NEYAQALAE G.ASVHYIYF THR...TSL W.....GEW MGVLHGDEIE
Tcalif WMDD.NNGIK NR.....DGLDDI VGDHNVICPL MHFVNKYTKF G.NGTLYYFF NHRAS..NLV W.....PEW MGVIHGYEIE
Tmarmor WMDD.HNGIK NR.....DGLDDI VGNHNVICPL MHFVNKYTKF G.NGTLYYFF NHRAS..NLV W.....PEW MGVIHGYEIE
Mouse WLHP.EDPTH LR.....DAMSAV VGDHNVVCPV AQLAGRLAAQ G.ARVYAYIF EHRAS..TLT W.....PLW MGVPHGIEIE
Rat WLHP.EDPAH LR.....DAMSAV VGDHNVVCPV AQLAGRLAAQ G.ARVYAYIF EHRAS..TLT W.....PLW MGVPHGIEIE
Fbs WLHP.EDPAR WR.....EALSDV VGDHNVVCPV AQLAGRLAAQ G.ARVYAYIF EHRAS..TSL W.....PLW MGVPHGIEIE
Human WLHP.EDPAR LR.....EALSDV VGDHNVVCPV AQLAGRLAAQ G.ARVYAYIF EHRAS..TSL W.....PLW MGVPHGIEIE
Chicken WLDA.DNPVK NR.....EALDDI VGDHNVVCPV MAFQAQWAQR G.GKVYAYIF DHRSS..TLL W.....PSW MGVPHGIEIE
* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Les clones obtenus:

Chez *A. gossypii*, 7 fragments amplifiés par PCR ont été clonés. 3 clones ont été obtenus et séquencés (tableau 10)

Tableau 10 : clones d'ADN génomique de larves et nymphes d'*Aphis gossypii*. (ADN extrait de plusieurs individus). (environ 100 nucléotides de chaque insert ont été séquencés)

NOM	AMORCES	taille appr. insert	taille minimale attendue	amorce séquencée	résultat séquence
AgSN5	C2 - C4	400	390 + I3'	C4	inconnue
AgSN14	B1 - B4	600	450 + I2 + I3	B1	inconnue
AgSN27	B1 - C4	700	450 + I2 + I3 + I3'	C4	inconnue

Chez *C. pipiens*, 39 fragments amplifiés ont été clonés. 35 clones ont été séquencés (tableaux 11 et 12). Chaque clone provient d'une amplification différente.

Tableau 11 : clones d'ADN génomique de *C. pipiens* (ADN extrait de plusieurs individus adultes)

NOM	SOUCHE	AMORCES	taille insert	taille minimale attendue	% séqu.	amorces séqu.	résultat séqu.
pSLc5.7	S-LAB	C2 - C4	400	390 + I3'	13	C4	inconnue
pCU11.3	TC	C2 - C4	400	390 + I3'	19	C4	inconnue
pSLa5.3	S-LAB	C2 - C4	400	390 + I3'	18	C4	inconnue
pSLb5.3	S-LAB	C2 - C4	400	390 + I3'	18	C4	inconnue
pSLb4.2	S-LAB	F1new - B4	700	330 + I3 + I3'	7	F1new	inconnue
pSLb4.7	S-LAB	F1new - B4	700	330 + I3 + I3'	9	F1new	inconnue
pSLb4.8	S-LAB	F1new - B4	700	330 + I3 + I3'	9	F1new	inconnue
pCU3.6	MRES	C1 - C4	1000	600 + I3 + I3'	7	C4	inconnue
pSLb8.2	S-LAB	C1 - C4	1000	600 + I3 + I3'	7	C4	inconnue
pSLc3.2	S-LAB	C1 - C4	1100	600 + I3 + I3'	5	C4	inconnue
pSLb2.2	S-LAB	B1 - C4	1000	450 + I2 + I3 + I3'	5	C4	inconnue
pSLa5.5	S-LAB	C2 - C5	800	690 + I3' + I4 + I5	9	C5	inconnue
pSLa6.5	S-LAB	C2 - C5	800	690 + I3' + I4 + I5	7	C5	inconnue
pSLa11.1	S-LAB	C2 - C5	900	690 + I3' + I4 + I5	7	C2	inconnue
pSLc6.2	S-LAB	C2 - C5	1000	690 + I3' + I4 + I5	3	C5	inconnue
pSLc6.6	S-LAB	C2 - C5	1000	690 + I3' + I4 + I5	6	C5	inconnue
pSLf9.4	S-LAB	C3 - B5	650	570 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	12	B5	inconnue
pSLf9.5	S-LAB	C3 - B5	650	570 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	8	C3	inconnue
pSLf11.1	S-LAB	C3 - B6	700	660 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	7	B6	inconnue
pSLf11.2	S-LAB	C3 - B6	700	660 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	9	B6	inconnue
pSLf11.3	S-LAB	C3 - B6	700	660 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	7	C3	inconnue
pSLf7.2	S-LAB	B3 - C6	900	900 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	7	C6	inconnue
pSLf7.7	S-LAB	B3 - C6	900	900 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	8	B3	inconnue
pSLf8.8	S-LAB	B3 - B6	1200	1020 + I3' + I4 + I5 + I6 + I7	6	B6	inconnue

Tableau 12: clones d'ADN génomique d'adultes de *Culex pipiens* obtenus avec F1new - G1new. Chaque clone provient d'une amplification différente sur des ADN génomiques provenant d'un ou de plusieurs individus.

NOM	AMORCES	taille insert	sous-espèce/ sensibilité Insectic. (*)	DNAg (**)	% séquence	Résultat séquence
MRES 9.6	F1new-G1new	570	Q / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
ESPRO 2.4	F1new-G1new	574	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
ESPRO 3.4	F1new-G1new	574	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
GARA 7.6	F1new-G1new	570	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
GARA 8.1	F1new-G1new	574	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
PADO 17.2 (')	F1new-G1new	574	P / R	1 ind.	90	gène <i>Ace2</i>
PADO 18.6	F1new-G1new	574	P / R	1 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
PR 10.22 (")	F1new-G1new	574	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
PR 11.3 (")	F1new-G1new	574	P / R	1 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
PR 12.4 (")	F1new-G1new	574	P / R	1 ind.	100	gène <i>Ace2</i>
TC 6.6	F1new-G1new	574	P / R	10 ind.	100	gène <i>Ace2</i>

(*) : Q = sous-espèce *quinquefasciatus* ; P = sous-espèce *pipiens*

S = sensible aux insecticides ; R = résistant

(**) : ind. = individu

('): souche PADOVA; ("): souche PRAIAS

Analyse des séquences et du polymorphisme:

Seul le couple d'amorces F1new-G1new, qui encadre l'intron 3, a donné une séquence de cholinestérase chez *C. pipiens*. L'alignement des séquences obtenues dans les différentes souches avec le gène *Ace2* de *C. pipiens* (annexe3) a montré une homologie peptidique de 100% de ces séquences avec le gène *Ace2*, à l'exception des clones GARA7.6 où deux mutations ont été observées (F158S et D162E) et MRES9.6 où on observe la mutation D162E.

La mutation F158S n'a pas été retrouvée dans les autres souches résistantes ni sur ADN génomique (tableau 13) ni sur ADNc. Cette mutation ne semble donc pas être impliquée dans la résistance. La mutation D162E trouvée dans les deux souches résistantes est intéressante mais elle a été aussi trouvée dans la souche sensible TEMR (clone TEMR14 sur ADNc).

Tableau 13: mutations observées dans les clones d'ADN génomique de *Culex pipiens*

N°DROSO:	125	141	146	156	158	162
PIPIENS MC	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
MRES9.6	T ACG	K AAG	H CAT	D GAT	F TTC	E GAG
ESPRO2.4	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
ESPRO3.4	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
GARA7.6	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	S TCC	E GAG
GARA8.1	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
PADO17.2			H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
PADO18.6	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
PR10.22	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
PR11.3	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
PR12.4	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT
TC6.6	T ACA	K AAA	H CAC	D GAC	F TTC	D GAT

Conclusion:

Avec le couple d'amorces F1new-G1new, on retrouve encore le gène *Ace2*, non impliqué dans la résistance. La stratégie des amorces définies sur les boîtes conservées n'a permis que de retrouver *Ace2*. Si la taille et le nombre des introns du gène recherché sont très différents de ceux de *Ace2*, le risque de ne pas cloner la bonne bande est important dans la mesure où il n'a été tenu compte dans le choix des bandes à cloner que de la taille de la partie codante correspondante ainsi que de la taille des introns connus de *Ace2* de *C. pipiens*. De plus, il existe un risque de ne pas avoir d'amplification si la taille de l'intron est trop grande.

4.2.2.4. Clonage à partir d'amorces spécifiques de la drosophile

L'ultime stratégie pour espérer cloner le gène *Ace1* a été d'utiliser des amorces spécifiques du gène codant pour l'AChE de drosophile. Chez cet insecte, il n'existe qu'un seul gène et celui-ci est impliqué dans la résistance aux insecticides. Il existe peut-être alors des homologues particulières avec le gène *Ace1* d'*A. gossypii* et de *C. pipiens*.

Les amorces utilisées:

Les amorces de drosophile dont nous disposons se répartissent tout au long du gène codant pour l'AChE (figure 40) aussi bien dans des régions conservées chez différentes espèces que celles spécifiques à la drosophile. Au total, 36 amorces spécifiques ont été testées (la séquence des amorces se trouve en annexe). Ces amorces ont aussi été testées en combinaison avec 20 amorces (dégénérées ou non dégénérées définies à partir des boîtes conservées, spécifiques de *Ace2*, "anti-pasa").

*: acides aminés conservés entre la drosophile et le poisson torpille *T. californica*.

```

                21F Y111G
              Y107Yv
            104 Y109G F115S
D.m GREVHVYTGI PYAKPPVEDL RFRKPVPAPFP WHGVLDATRL SATCVQERYE YFGFSGEEI
      ** * * ***          * * * * *          * * | * ***** *
                                I2
W121A      SEQ1                      I3
    121      131                      |                      OL23
D.m. WNPNTNVSED CLYINVWAPA KARLRHGRGA NGGEHPNGKQ ADTDHLIHNG NPQNTTNGLP
      ****      *** * * * * *
                                OL67
                                OL68
                                OL69
M191Y I199V                      V220L
D.m. ILIWIYGGGF MTGSATLDIY NADIMAAVGN VIVASFQYRV GAFGLHLAP EMPSEFAEEA
      *****      ** * * * * *          *          * * * * *          **
                                OL85
                                S276A
                                276
D.m. PGNVGLWDQA LAIRWLKDNA HAFGGNPEWM TLFGESAGSS SVNAQLMSPV TRGLVKRGMM
      ***** * *          * * * *          * * * * *          **          **          * *          *
                                S310Gv
                                C328Wv
                                I4
G303A      T313G                      330                      |                      345                      359
D.m. QSGTMNAPWS HMTSEKAWEI GKALINDCNC NASMLKTNPV HMVSCMRSDV AKTISVQQWN
      ***          * * *          *          * * *          *          *          *          **
                                F409I
                                Y408I D413G
                                Y412C
                                Y412I
                                405
D.m. -SYSG-ILSF PSAPTIDGAF LPADPMTLMK TADLKDYDIL MGNVRDEGTY FLlyDFIDYF
      * *          * * * * *          *          *          *          * * *          ** *          *
                                I5
K420G      SEQ3                      I6
    **          *          *          |          *          *          *          *          *
D.m. DKDDATALPR DKYLEIMNNI FGKATQAERE AIIFFQYSWE G-NPGYQNQQ QIGRAVGDMF
      **          *          *          *          *          *          *          *          *
                                I7
                                W510G
                                518
D.m. FTCPTNEYAQ ALAERGASVH YYYFTHRTST SLWGEGMWGL HGDEIEYFFG QPLNNSLOQR
      **          *          * * * *          * * * * *          * * * *          * *          *
                                I8
                                |
                                N569S
D.m. PVERELGKRM LSAVIEFAKT GNPAQDGEEW PNFSKEDPVY YIFSTDCKIE KLARGPLAAR
      * * *          * * *          * * *          *          *          *

```

Les clones obtenus:

Chez *A. gossypii*, 4 fragments amplifiés par PCR ont été clonés. Les clones figurent dans le tableau 14.

Tableau 14 : clones d'ADN génomique de larves et nymphes d'*Aphis gossypii*. (ADN extrait de plusieurs individus). (environ 100 nucléotides de chaque insert ont été séquencés)

NOM	AMORCES	taille appr. insert	taille minimale attendue	amorce séquencée	résultat séquence
AgR7	21F - V220L	500	330 + I3	V220L	inconnue
AgR4	21F - SHM	800	600 + I 3	SHM	inconnue
AgSN4	21F - SHM	1100	600 + I3	SHM	inconnue
AgSN3	OL68 - Y408I	800	600 + I4	Y408I	inconnue

Chez *C. pipiens*, 9 fragments amplifiés ont été clonés. Les clones sont mentionnés dans le tableau 15.

Tableau 15 : clones d'ADN génomique de *C. pipiens* (ADN extrait de plusieurs individus adultes)

NOM	SOUCHE	AMORCES	taille insert	taille minimale attendue	% séq.	amorces séq.	résultat séq.
pTC6/c1.4	TC	B1 - W121A	700	180 + I2	9	W121A	inconnue
pTC6/c4.2	TC	OL44 - SEQ2	900	270 + I2	8	SEQ2	inconnue
pT11R7	TEMR	B1 - Y111G	1000	150 + I2	70	B1	inconnue
pT11R8	TEMR	B1 - Y111G	1000	150 + I2	68	Y111G	inconnue
pT12RI4	TEMR	B1 - W121A	1000	180 + I2	45	W121A	inconnue
pT13R10	TEMR	B1 - S276A	1500	630 + I2 + I3 + I3'	30	S276A	inconnue
pMR9/9.9	MRES	S310Gv- H518K	1100	630 + I4 + I5 + I6 + I7	6	H518K	inconnue
pTC6/c6I.5	TC	S310Gv- H518K	700	630 + I4 + I5 + I6 + I7	10	H518K	inconnue
pTC6/c6S.4	TC	S310Gv- H518K	700	630 + I4 + I5 + I6 + I7	10	H518K	inconnue

Conclusion:

Par cette stratégie, il n'a pas été possible de retrouver une séquence d'un gène codant pour une acétylcholinestérase. Les amorces utilisées ne sont peut-être pas suffisamment

homologues des gènes *Ace1* et *Ace2* d'*A. gossypii* et de *C. pipiens* pour les différentes conditions PCR testées.

4.2.2.5. Etude de la variabilité de l'intron 3

Sur une souche de *C. pipiens* originaire d'Hawaï aux Etats Unis, l'analyse des séquences de l'intron 3 obtenues par Dina Fonseca (Molecular Genetics Laboratory, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Washington) (comm. pers.) a fait apparaître une séquence de 11 nucléotides surnuméraires par rapport aux séquences obtenues chez des souches ayant été étudiées par Bourguet (1996a) appartenant soit à la sous-espèce *quinquefasciatus*: SLAB, SUPERCAR, MRES, BEIJING, soit à la sous-espèce *pipiens*: MSE, PRAIAS et BRUGES-A, ou la souche étudiée par Colin Malcolm (Malcolm *et al.*, 1998).

Il faut noter l'existence de deux sites de restriction *ScaI* en début et fin de l'intron 3 qui permettent de distinguer la sous-espèce *quinquefasciatus* de *pipiens* (Bourguet, 1996a; Bourguet *et al.*, 1998a).

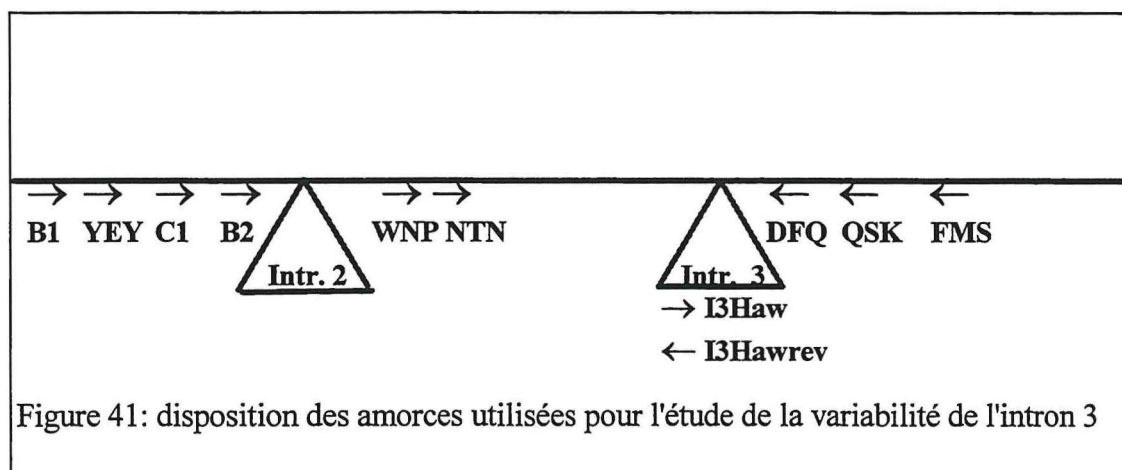
Cette séquence de 11 nucléotides pourrait être une caractéristique du gène *Ace1* recherché et donc être un marqueur de la présence de ce gène.

Les amorces utilisées:

Deux amorces dont la séquence nucléotidique incluait les 11 nucléotides particuliers à la souche d'Hawaï ont été élaborées:

- l'amorce sens: I3Haw
- l'amorce reverse, I3Hawrev.

Ces amorces ont été combinées soit à des amorces spécifiques du gène *Ace2* d'*A. gossypii* (WNP) ou de *C. pipiens* (DFQ, NTN, YEY) soit à des amorces définies à partir des boîtes conservées (B1, B2, C1) (figure 41).



PIP. MC début intron3
 GAC GTATGTACTTCTTCTTCTTG::::::::::::TTAGTACACAGT
HAWAI L/P GAC GTAAGTACTCTGTC::CTTG**CCGAGCTGCC**ATAAGGACACTAT
I3Haw: 5' TCTGTC::CTTG**CCGAGCTGCCA** 3'
I3Hawrev: 3' AGACAG::GAACGGCTCGACGGT 5'

PIP. MC: souche de *Culex pipiens* étudiée par Colin Malcolm
 (Malcolm et al., 1998)

Au total, 12 combinaisons d'amorces ont été testées chez *A. gossypii* et *C. pipiens*. Dans le cas d'*A. gossypii*, les PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique extrait d'une cinquantaine d'individus sensibles et résistants. Chez *C. pipiens*, les PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique extrait d'un seul ou de 10 individus chez toutes les souches dont nous disposions.

Les clones obtenus:

Chez *A. gossypii*, 5 bandes PCR ont été clonées. 1 clone a été séquencé (tableau 15).

10 fragments amplifiés ont été clonés chez *C. pipiens*. 4 clones ont été séquencés (tableau 16).

Tableau 15: clones d'ADN génomique d'*Aphis gossypii* (souche sensible de Navacelle)

NOM	AMORCES	taille appr. Insert	taille minimale attendue	% séquencé	amorce séquencée	résultat séquence
AgSf10.6	WNP - I3Hawrev	500	135	18	WNP	inconnue

Tableau 16 : clones d'ADN génomique de *C. pipiens* (larves ou adultes)

NOM	SOUCHE	AMORCES	taille insert	taille mini. attendue	% séquencé	amorce séquencée	résultat séquence
CU1.6	ESPRO	B1 - I3Hawrev	300	290	30	B1	inconnue
CU2.3	PRAIAS	B1 - I3Hawrev	300	290	17	B1	inconnue
CU12.4	TC	I3Haw - DFQ	500	400	15	I3Haw	inconnue
CU14.8	PADOVA	I3Haw - DFQ	500	400	19	I3Haw	inconnue

Conclusion:

Les PCR effectués avec des amorces spécifiques de cette insertion au niveau de l'intron 3 n'ont pas permis de retrouver des séquences dont la partie codante correspondait à une cholinestérase. Cette insertion n'a pas non plus été retrouvée dans les clones de *C. pipiens* ayant été obtenus avec le couple d'amorces dégénérées F1new-G1new (alignements en annexe 4).

L'hypothèse la plus probable est que cette insertion au niveau de l'intron soit spécifique à cette souche et non pas en relation avec un gène différent du gène connu. On retrouve d'ailleurs des insertions au niveau des introns chez diverses souches de drosophile (Fournier *et al.*, 1989). Mais il faut quand même remarquer qu'aucune insertion n'a été observée dans l'intron 3 chez les 9 souches dont on a séquencé l'intron après amplification avec le couple d'amorces F1new - G1new.

5. DISCUSSION: NOMBRE DE GENES CODANT POUR L'ACHÉ ET NATURE DE L'ENZYME SYNAPTIQUE

Les différentes stratégies de clonage du gène codant pour l'ACHé chez le puceron *Aphis gossypii* et le moustique *Culex pipiens* ont été basées sur des amplifications par PCR avec différentes amorces: des amorces dégénérées ou non dégénérées définies à partir des séquences peptidiques conservées entre des espèces appartenant aux vertébrés et aux invertébrés ainsi que des amorces spécifiques du gène de la drosophile.

Les travaux menés sur ADN complémentaire et ADN génomique ont abouti à l'obtention de trois clones: deux indépendants avec les couples d'amorces F1new - B5 et D1S - D1R et un clone "semi-indépendant" par rapport au premier avec le couple d'amorces F1new - G1new.

Ces clones ont été obtenus des souches suivantes:

couple d'amorces F1new - B5: souche résistante d'*A. gossypii* et souche TEMR sensible de *C. pipiens*

couple d'amorces D1S - D1R: souche PRAIAS résistante de *C. pipiens*.

couple d'amorces F1new - G1new: souches résistantes de *C. pipiens*: MRES, ESPRO, GARA, PADOVA, PRAIAS, TC.

Tous ces clones correspondraient au gène *Ace2*, qui ne serait pas impliqué dans la résistance aux insecticides organo-phosphorés et carbamates. Ce résultat a été étayé par la présence dans les clones des souches résistantes d'un polymorphisme élevé peu compatible avec la notion de résistance par pression de sélection. Il existerait donc deux gènes codant pour deux acétylcholinestérases différentes.

Ces résultats sont en accord avec les travaux sur l'enzyme elle-même où deux enzymes ont été mises en évidence chez *C. pipiens* (Bourguet *et al.*, 1996b). Les caractéristiques catalytiques différentes de ces deux enzymes ainsi que les études de l'hérédité de la résistance ont abouti à l'hypothèse de l'existence de deux gènes *Ace1* et *Ace2* localisés sur deux chromosomes différents. *Ace2* serait lié au locus sexuel et ne serait pas impliqué dans la résistance aux insecticides alors que *Ace1* aurait une transmission

autosomale et serait impliqué dans la résistance. Des travaux de marquage moléculaire de gènes de résistance ont été réalisés sur le moustique *Aedes aegypti* par Severson *et al.* (1997): le gène codant pour l'AChE ne serait pas situé sur aucun des loci connus de résistance mais sur un locus très proche du locus sexuel, ce qui rejoint les résultats obtenus sur *C. pipiens*. Chez *A. aegypti*, ce serait donc *Ace2* qui aurait été cloné.

La présence de deux loci sur deux chromosomes différents révélés par hybridation *in situ* sur le moustique *Anopheles stephensi* (Malcolm et Hall, 1990) suggère l'existence de deux gènes codant pour l'AChE. Il faut noter que chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, quatre gènes, localisés sur trois chromosomes différents, ont été identifiés à ce jour, dont deux gènes codant pour une AChE synaptique (Arpagaus *et al.*, 1998).

L'absence de différences entre les séquences d'une souche sensible et celles d'une souche résistante aux insecticides chez l'acarien *Boophilus microplus* (Baxter et Barker, 1998; Hernandez *et al.*, 1999) ainsi que chez le moustique *Anopheles albimanus* (Hall, non publié), va aussi dans le sens de l'existence de deux gènes.

Chez *C. pipiens*, *A. gossypii*, chez les moustiques *A. aegypti* et *A. albimanus* et chez l'acarien *B. microplus* le gène cloné coderait pour une enzyme non impliquée dans la résistance. Cette enzyme ne serait donc pas impliquée dans la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses.

Dans la mesure où deux gènes existent, comment se fait il que le gène *Ace1* n'ait toujours pas été identifié ?

Trois hypothèses peuvent être émises concernant la structure du gène *Ace1*:

1. la séquence codante serait voisine de la séquence du gène *Ace2* et les introns auraient une taille identique
2. la séquence codante serait voisine de la séquence du gène *Ace2* mais les introns auraient une taille très différente
3. ce gène aurait une séquence codante très différente

Dans l'hypothèse de deux gènes ayant des séquences codantes voisines (hypothèse 1), ils doivent normalement être co-amplifiés par PCR sur ADN génomique. Mais si un nombre insuffisant de clones a été séquencé par amplification, comme ce fut généralement le cas dans nos travaux menés sur *A. gossypii* et *C. pipiens*, il est possible de ne pas être tombé sur *Ace1*. Il avait été envisagé une stratégie pour essayer d'amplifier préférentiellement le gène inconnu: en digérant le produit PCR par une enzyme de restriction dont le site est conservé chez les espèces ayant le gène *Ace2*, nous espérions un enrichissement en *Ace1* au cours de la PCR suivante. Mais il n'a pas été possible de trouver un seul site de coupure conservé.

L'hypothèse d'introns de taille très différente (hypothèse 2) a été émise à la suite de l'analyse des profils RFLP sur ADN génomique de *C. pipiens* (travaux de D. Bourguet) dont la sonde était un fragment PCR de 700 pb encadrant l'intron 3. Les hybridations n'ont fait apparaître qu'une seule bande. Cela suggère que l'intron 3 de *Ace1* doit être suffisamment différent (en taille ou en séquence nucléotidique) de celui du gène *Ace2* pour que la sonde ne puisse s'hybrider. Mais on ne peut aussi écarter la possibilité que cette sonde soit spécifique du gène *Ace2* et de ce fait il est normal de ne voir qu'une seule bande.

Dans cette hypothèse, il est très possible de n'avoir pas pu amplifier par PCR sur ADN génomique les fragments correspondant au gène *Ace1* lorsque les amorces encadraient un intron trop long pour être amplifiable. Ou bien, lorsqu'il y a eu amplification, nous n'avons pas su choisir les bandes à cloner correspondant à ce gène, ne connaissant pas la taille des introns. Mais pourquoi ne pas envisager alors l'existence d'autres introns au sein de ces parties codantes ?

De même, et c'est une possibilité à ne pas éliminer, une seule bande visible pourrait signifier la présence d'un unique gène. C'est ce que suggèrent Severson *et al.* (1997) au terme de travaux de marquage moléculaire de gènes de résistance réalisés sur le moustique *Aedes aegypti*: la présence d'une seule bande après hybridation d'ADN génomique par une sonde (un clone d'ADNc du gène codant pour l'AChE d'*A. aegypti* (Severson *et al.*, 1993)) indiquerait qu'il n'existe qu'un seul gène codant pour l'AChE. Ce gène coderait de ce fait pour l'AChE impliquée dans la résistance.

D'un point de vue évolutif, l'hypothèse de deux gènes peut s'expliquer si l'on admet qu'il y a eu duplication ancienne d'un gène ancestral. Le gène non synaptique, *Ace2*, non vital pour l'organisme, pourrait avoir évolué différemment selon l'organisme. L'absence de ce gène chez les vertébrés ou chez la drosophile pourrait signifier que ce gène n'aurait même plus les caractéristiques d'un gène codant pour une hydrolase à sérine et ne serait donc plus détectable avec les stratégies PCR. Il se pourrait aussi que le gène codant pour la butyrylcholinestérase (BuChE) des vertébrés corresponde à ce gène. Le gène cloné chez *A. gossypii* et *C. pipiens* pourrait être l'équivalent du gène codant pour la BuChE, non impliquée dans la transmission de l'influx nerveux.

Brenner (1988) a analysé la composition nucléotidique du codon de la sérine du site catalytique de plusieurs protéines dont l'acétylcholinestérase. Il en a conclu que ces protéines à sérine ont évolué en deux lignées, une dont le codon est AGY (AGC, AGT) et l'autre TCN (TCA, TCG, TCC, TCT), à partir d'une protéine ancestrale peu ou pas active dont l'acide aminé impliqué dans la réaction catalytique ne pouvait être qu'une cystéine (dont le codon est TGY).

Dans le cas de l'acétylcholinestérase, le codon de la sérine des deux organismes dont la séquence du gène était connu à cette époque, celle du poisson torpille (AGT) et celle de la drosophile (TCG), lui a fait penser que l'enzyme des insectes aurait divergé très tôt de celle des vertébrés au cours de l'évolution.

Si pour des organismes proches, les deux types de codons de la sérine étaient trouvés, cela indiquerait l'existence de deux gènes d'origine différente chez ces organismes. En effet, pour passer de TCN à AGY, il faut deux événements de mutation et donc passage obligatoire par un codon ne donnant pas une sérine. L'enzyme exprimée serait donc non fonctionnelle, ce qui n'est pas concevable pour une enzyme vitale. Il doit donc exister deux gènes codant pour deux enzymes différentes.

Chez certains organismes, l'enzyme synaptique aurait une sérine du type TCN et chez d'autres organismes, la sérine serait du type AGY. Dans les deux cas, l'enzyme non synaptique peut être soit très proche de l'enzyme synaptique et avoir une sérine catalytique soit n'être plus une sérine, auquel cas l'enzyme n'est plus une hydrolase à sérine comme nous

l'avons suggéré pour la drosophile. Il pourrait s'agir d'une protéine: une thyroglobuline, la neurotactine ou la glutactine.

Sur l'arbre phylogénétique des acétylcholinestérases et des butyrylcholinestérases séquencées à ce jour, lorsque la séquence nucléotidique était disponible, le codon de la sérine catalytique a été mentionnée (figure 42). Chez tous les vertébrés, la séquence de la sérine est du type AGY. Chez les invertébrés, les deux types de codon existent: AGY chez un mollusque (*Loligo opalescens*), TCN chez les insectes, AGY chez les acariens (tiques), AGY et TCN chez les nématodes (TCN pour les quatre gènes identifiés chez *Caenorhabditis elegans*, TCN pour les deux gènes chez *C. briggsae*, AGY chez le gène identifié chez *Meloidogyne incognita* et *M. javanica*). Les nématodes constitueraient donc pour l'instant le seul groupe à posséder deux gènes d'origine différente mais cela demande à être confirmé sur d'autres espèces. Le cas des nématodes serait donc une exception et ne peut être étendu à l'ensemble du règne animal.

Pour l'instant, l'analyse du codon de la sérine du site catalytique ne permet donc pas d'étayer l'hypothèse de deux gènes d'origine différentes chez les insectes.

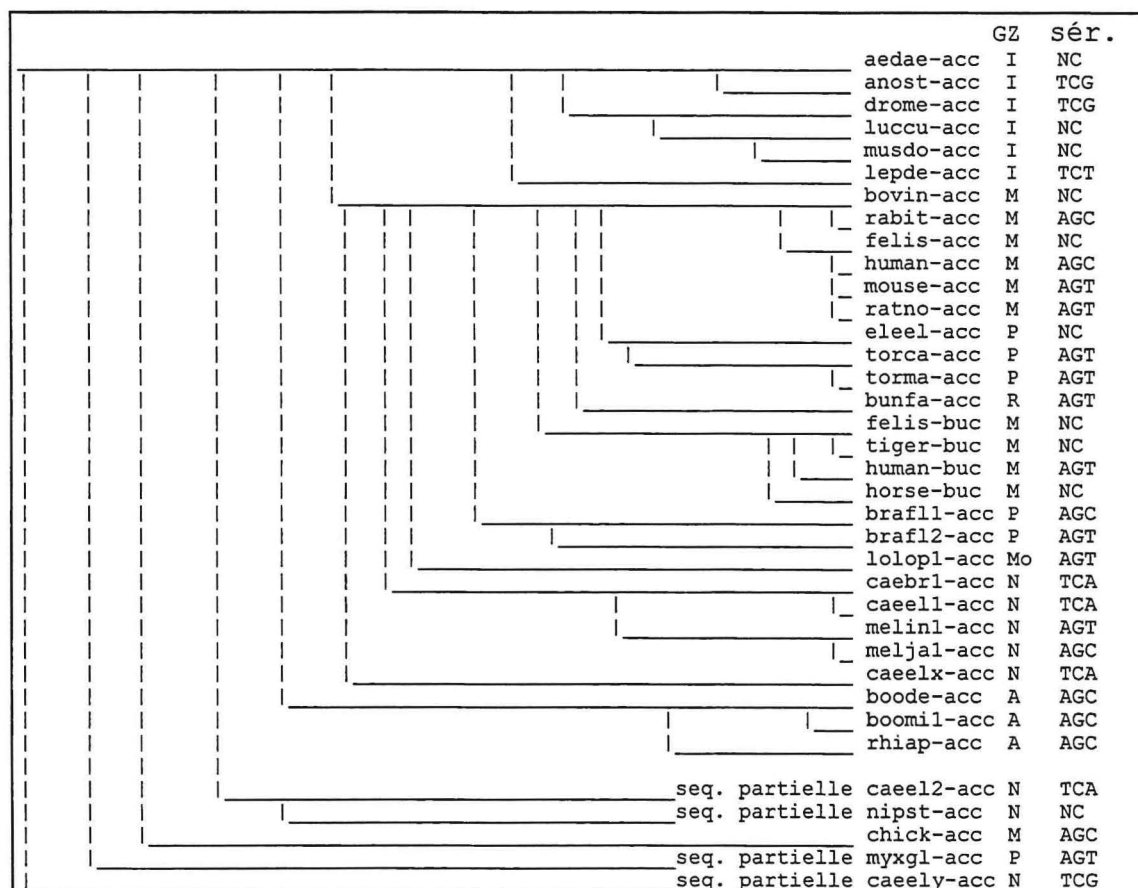
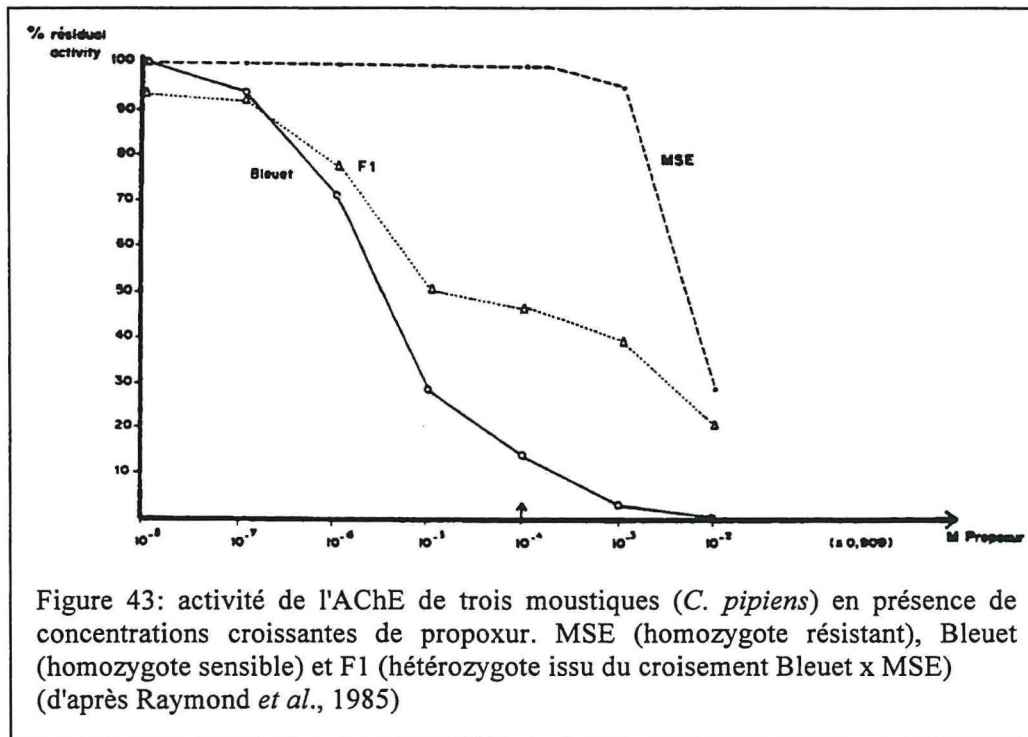


Figure 42: arbre phylogénétique des acétylcholinestérases et butyrylcholinestérases et composition nucléotidique de la sérine catalytique (ser.) (d'après Genebee).

GZ: groupe zoologique; I: insectes; M: mammifères; P: poissons; R: reptiles; Mo: Mollusques; N: nématodes; A: acariens; NC: non connue

Tous les travaux menés sur *C. pipiens* et *A. gossypii* reposent sur l'hypothèse que le mécanisme de résistance est une modification du fonctionnement de l'AChE liée à des mutations ponctuelles. Mais la résistance ne pourrait-elle pas être le résultat de l'action d'une molécule qui interférerait avec l'inhibiteur au niveau du site actif de l'enzyme? Dans ce cas, l'enzyme des insectes résistants pourrait effectivement tolérer une certaine variabilité car elle ne serait pas directement la cible des insecticides. L'analyse de la courbe d'activité de l'AChE en présence de concentrations croissantes d'un insecticide carbamate (propoxur) chez les individus hétérozygotes de la génération F1, issue du croisement entre des homozygotes résistants et des homozygotes sensibles (figure 43), semble infirmer l'hypothèse de

l'existence de cette molécule. En effet, la courbe d'activité enzymatique des hétérozygotes devrait être monophasique et non biphasique car cette molécule devrait agir aussi bien sur l'enzyme sensible que l'enzyme résistante, quelle que soit la concentration en inhibiteur.



Si aucune stratégie n'a permis d'identifier le gène impliqué dans la résistance, c'est peut-être que le mécanisme de résistance fait intervenir une enzyme très différente (hypothèse 3) n'appartenant pas à la famille des cholinestérases mais capable d'hydrolyser l'acétylcholine synaptique. La résistance se manifesterait, comme dans le cas d'une acétylcholinestérase, par une insensibilité de l'enzyme aux inhibiteurs. Cette enzyme pourrait être par exemple une hydrolase à sérine de type estérase, dont l'acquisition de l'activité cholinestérasique serait le résultat de mutations ponctuelles.

Dans un individu résistant, il serait alors tout à fait possible de trouver à la fois cette estérase modifiée impliquée dans la résistance et une acétylcholinestérase non impliquée dans la résistance. Ce serait donc cette acétylcholinestérase qui aurait été clonée. Les stratégies de clonage par PCR avec des amorces définies dans les boîtes conservées d'AChE ne seraient donc pas adaptées pour cloner le gène codant pour une enzyme appartenant à une famille différente.

C. ETUDE DE LA RELATION ENTRE LA QUANTITE D'ACETYLCHOLINESTERASE ET LA RESISTANCE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* Meig (DIPTERA, DROSOPHILIDAE) AUX INSECTICIDES

publication 1: Charpentier A., Menozzi P., Marcel V., Villatte F., Fournier D., 1999. Acetylcholinesterase overproduction as contribution to insect resistance to insecticide in natural populations. Soumise à *Genetics*.

Les mutations responsables de la résistance de l'AChE aux insecticides organo-phosphorés et carbamates sont des mutations ponctuelles d'un acide aminé sur la protéine qui devient moins sensible. En étudiant les souches résistantes, nous avons recherché si un autre mécanisme ne pouvait pas entrer en jeu dans la résistance: la surproduction de l'enzyme. Cette surproduction enzymatique rendrait l'insecte résistant car la synapse contient assez d'enzyme fonctionnelle même en présence d'insecticide.

L'hypothèse du rôle de la surexpression de l'enzyme dans la résistance aux insecticides a été émise par Fournier *et al.* (1992c) à la suite de tests toxicologiques effectués sur des souches de drosophile obtenues par transgénèse exprimant des quantités variables d'AChE selon la souche: Il existe une corrélation entre cette quantité et le niveau de résistance à un insecticide organo-phosphoré, le malathion.

Un dosage de la quantité d'AChE a été effectué sur 82 souches issues de populations naturelles de drosophile. Pour cela une technique a été au préalable mise au point pour permettre le dosage de l'enzyme sur extrait brut. La méthode est basée sur une inhibition rapide de l'enzyme par un organo-phosphoré puissant, le MEPQ (7-(méthyléthoxyphosphinyloxy)1-méthyl-quinolinium iodide).

Il est apparu que la quantité d'enzyme variait d'un facteur 2 au maximum par rapport à la souche de référence Canton-S. Il est vraisemblable, qu'une variation plus importante s'accompagnerait d'un coût trop important, la cholinestérase en trop grande quantité affectant le bon déroulement du passage de l'influx nerveux au niveau de la synapse. Aucune souche

n'a été trouvée avec une quantité d'enzyme inférieure à 90% de celle de la souche de référence, ce qui suggère que cette quantité d'enzyme correspond à la meilleure valeur adaptative de la drosophile.

D'autre part, il a été montré qu'il existait une corrélation entre la quantité d'enzyme et la résistance au parathion: les souches surexprimant l'AChE se trouvent parmi les souches résistantes à cet insecticide. Les niveaux de résistance atteints par l'augmentation de la quantité d'enzyme produite demeurent faibles. Ce mécanisme ne peut à lui seul expliquer les niveaux de résistance atteints dans certaines souches. La surexpression de l'enzyme serait associée à d'autres mécanismes de résistance dont la modification de l'enzyme par mutations ponctuelles principalement chez les souches ayant subi une forte pression insecticide. La surexpression de l'AChE aurait pour effet de diminuer le coût lié aux mutations ponctuelles de l'enzyme résistante dont l'efficacité pour hydrolyser le neurotransmetteur est moindre.

Chez la drosophile, la surexpression de l'AChE ne semble pas être le résultat d'une duplication du gène, comme cela a été montré chez *Culex pipiens* (Bourguet *et al.*, 1996c), car la variation de la quantité d'enzyme produite est continue. Cette surexpression enzymatique pourrait alors résulter d'une surtranscription, conséquence de mutations au niveau du promoteur ou dans un facteur de transcription ou encore d'une augmentation de la stabilité des ARN messagers.

Publication 1, soumise à *Genetics*:

Acetylcholinesterase overproduction as contribution to insect resistance to insecticide in natural populations. Charpentier A., Menozzi P., Marcel V., Villatte F., Fournier D..

Acetylcholinesterase overproduction as contribution to insect resistance to insecticide in natural populations.

Alice Charpentier, Philippe Menozzi, Véronique Marcel, François Villatte and Didier Fournier

Laboratoire de Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologiques, Groupe de Biochimie des Protéines, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France.

Corresponding author: Didier Fournier, Université Paul Sabatier, LSPCMIB, Bat 4R3, 31062 Toulouse, France. e-mail: fournier@cict.fr

Abbreviations : MEPQ, 7-(methylethoxyphosphinyloxy)1-methyl-quinolinium iodide ; ChlM: chlorpyrifos-methyl-oxon; ChlE, chlorpyrifos-ethyl-oxon ; AChE : acetylcholinesterase.

ABSTRACT

Scoring 82 strains originating from several countries showed that the amount of the enzyme varied by up to a factor of two and was directly correlated to insecticide resistance suggesting that increased acetylcholinesterase production is an additional mechanism of resistance. Increase of acetylcholinesterase levels also appears to be a modifier of active site point mutations responsible for the relative insensitivity of acetylcholinesterase to insecticide since overproduction of acetylcholinesterase can compensate for the decrease of neurotransmitter hydrolysis which usually comes with active site modification. Before being able to show an increase in acetylcholinesterase levels, a method using irreversible inhibitors have been developed to estimate the amount of enzyme in insects. Among the irreversible inhibitors tested, were found to be sufficiently potent and specific: 7-(methylethoxyphosphinyloxy)1-methyl-quinolinium iodide, chlorpyrifos-ethyl-oxon, and coumaphos-oxon.

Keywords : acetylcholinesterase, titration, drosophila, insecticide, resistance, over-expression

INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) terminates nerve impulses by catalyzing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. It is a key enzyme in the insect central nervous system in which the cholinergic system is essential. Its essential character has been exploited to produce organophosphorous and carbamate insecticides which inhibit AChE. Extensive use of these insecticides in pest control has resulted in the occurrence of resistance. Three main mechanisms have been evidenced: increased hydrolysis, decreased penetration and diminished target sensitivity. Their combinations in the same insect may result in high resistance and in failure of field treatments (Raymond *et al.*, 1989).

Modified AChEs, less sensitive to organophosphorous and carbamate insecticides, have been evidenced in many arthropod species (reviewed in Fournier and Mutero, 1994). Several resistance point-mutations have been identified in *Drosophila melanogaster* (Fournier *et al.*, 1992 ; Mutero *et al.*, 1994), *Drosophila simulans* (Cochrane *et al.*, 1997), *Musca domestica* (Feyereisen, 1995) and *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu *et al.*, 1996).

Besides qualitative modifications of the active site, efficiency of insecticides may also depend on the amount of AChE present in the insect. Indeed, we may hypothesize that insects with low amounts of AChE are more susceptible than insects with high amount of AChE. This hypothesis has been suggested by several independent sets of data. Firstly, qualitative mutations are usually semidominant, i.e. the resistance level of heterozygous insects appears lower than that in homozygous animals. As the degree of dominance was found to be independent of the chemical used and of the degree of resistance, Smissaert *et al.* (1975) hypothesized that the degree of dominance is due to the dose effect and consequently hypothesized that the AChE amount affects insecticide resistance. Secondly, modification of the AChE amount by lethal mutations and transformation with a minigene, affected the sensitivity to an insecticide, malathion (Fournier *et al.*, 1992). A 2-fold decrease in quantity of enzyme resulted in a 2-fold decrease in resistance. This experiment suggested that an increased amount of AChE may confer insecticide resistance but did not provide evidence that this mechanism exists in field populations. Thirdly, an increase of AChE activity has been reported in some field resistant insect strains (Tripathi and O'Brien, 1973 ; Voss, 1980). Nevertheless, this rise in activity may also originate from point mutations in the active site

leading to an increase of specific activity. Indeed, increased activity can be either due to faster substrate hydrolysis rate or to an increased amount of the enzyme.

As reports of resistant insects with higher amounts of AChE had never been ascertained, we collected several drosophila strains from the field, and scored the AChE levels. We found that the amount of AChE differs between the strains and is correlated to insecticide resistance.

MATERIAL AND METHODS

Strains analyzed

82 strains were collected from several parts of the world (18 from USA-Canada, 8 from South America and Pacific, 4 from Caribbean Sea, 21 from Oceania, 18 from Europe, 9 from Africa and 4 from Asia). They were sent to us by Tom Wilson (Colorado State Univ.), Eric Bonnivard (Univ. Paris 6), Philip Daborn (Melbourne Univ.) and Robert Delorme (INRA, Versailles). The strain Canton-S, collected at the beginning of the century in the USA and susceptible to insecticide, was used as reference. Two modified strains were used to test the method: ACT-J, a transformed strain with 2-fold more AChE than the reference (Berrada and Fournier, 1997) and *Ace*¹²⁶, a strain bearing one allele with a lethal mutation (*Ace*¹²⁶) and a wild type allele, this strain has 2-fold less AChE than the reference strain (Hall and Kankel, 1976).

Crude extracts were prepared by grinding adult male flies in 25 mM phosphate buffer pH 7 (100 μ L per fly) and centrifugation for 30 s at 12000 g. The supernatants were used as the enzyme source. Purified *D. melanogaster* AChE was obtained by *in vitro* production in baculovirus infected cells as previously described (Estrada-Mondaca and Fournier, 1998). The concentration of the enzyme was determined by tryptophan fluorescence. The enzyme has an identical primary structure and pharmacological behavior to AChE from Canton-S, ACT-J and *Ace*¹²⁶.

Inhibitors

7-(Methylethoxyphosphinyloxy)1-methyl-quinolinium iodide (MEPQ) was synthesized following the method of Levy and Ashani (1986). Chlorpyrifos-ethyl-oxon (ChIE) was a gift from Pr. Marty (Perpignan, France). All other inhibitors were obtained from Cluzeau (Bordeaux, France) or Sigma.

Toxicological tests

Insecticide bioassays were carried out by feeding *D. melanogaster* larvae with rearing medium (10% glucose, 10% yeast extract, 2.5% agar, 0.5% sodium p-hydroxybenzoate) containing different concentrations of parathion. The concentration of parathion was adjusted for each strain to obtain between 0 and 100% mortality. 30 eggs were laid on the rearing medium and the larvae allowed to grow at 25°C. The reference consisted of 30 eggs kept under the same conditions, but without insecticide. Mortality was recorded as the proportion of pupae after 13 days. LD₅₀ values were determined by fitting log dose against mortality data to a sigmoid curve by non-linear regression.

Enzyme activities

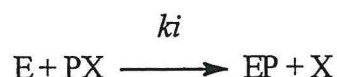
To estimate AChE activity, the method of Ellman *et al* (1961) was followed, using 1 mM acetylthiocholine as substrate in 25 mM phosphate buffer pH7 at 25°C. Non-specific esterase activity was determined using 1 mM 4-methyl-umbelliferyl acetate as substrate in 25 mM phosphate buffer pH 7 at 25°C and product of the reaction was recorded by absorbance at 340 nm.

Determination of the level of AChE.

The mechanism inhibition of AChE by organophosphate or carbamate compounds has been described by Aldridge (1950) :



with E = enzyme, PX = carbamate or organophosphate, X = leaving group. The inhibitor phosphorylates or carbamoylates the active site serine, and the inhibition can be considered as irreversible in the first 30 min. This scheme can be simplified with the bimolecular rate constant $ki = k_2/Kd$.



To follow the inhibition, the enzyme was incubated for various times with inhibitor at 25°C in 25 mM phosphate buffer pH7. The variation of the remaining free enzyme [E]/[E₀] with time was estimated by sampling aliquots at various times and recording the remaining activity with

1 mM acetylthiocholine (Ellman *et al.*, 1961). Disappearance of free enzyme ([E]) or disappearance of organophorous compound ([PX]) follows second order kinetics.

$$v = -\frac{d[E]}{dt} = -\frac{d[PX]}{dt} = k_i \cdot [E] \cdot [PX]$$

Integration of this equation indicates the remaining activity with time.

$$\frac{[E]}{[Eo]} = \frac{[PX]}{[PXo]} \cdot e^{-k_i \cdot t \cdot ([PXo] - [Eo])} \quad (\text{equation 1})$$

where t represents the time of incubation, [PXo] and [Eo] are initial concentrations of inhibitor and enzyme respectively, [PX] and [E] are concentrations of inhibitor and enzyme at different times. In this equation, [Eo], [PX] and k_i are unknown.

One molecule of inhibitor reacts with one molecule of enzyme $[PX] = [PXo] - [Eo] + [E]$. Consequently [PX] can be withdrawn from equation 1 to give equation 2

$$\frac{[E]}{[Eo]} = \frac{([PXo] - [Eo]) \cdot e^{-k_i \cdot t \cdot ([PXo] - [Eo])}}{[PXo] - [Eo] \cdot e^{-k_i \cdot t \cdot ([PXo] - [Eo])}} \quad (\text{equation 2})$$

and two unknown parameters remain in this equation, [Eo] and k_i

When $[Eo] \ll [PXo]$, equation 2 can be simplified to:

$$\frac{[E]}{[Eo]} = e^{-k_i \cdot t \cdot [PXo]} \quad (\text{equation 3})$$

The reaction is pseudo first order and one unknown parameter (k_i) remains.

Estimations of k_i and [Eo] was performed by multiple non linear regression on equation 2 and estimation of k_i was performed by linear regression on equation 3 when [Eo] was not necessary.

RESULTS

Methods to estimate the levels of AChE in drosophila

To estimate the amount of AChE present in an insect, in order to test if AChE is over-transcribed in some resistant strains, we needed a technique not needing the enzyme to be purified. We first developed an Elisa test and western blot with polyclonal antibodies obtained either with the purified enzyme or with peptidic fractions of the protein expressed in *E. coli* (Fournier *et al.*, 1988). But all the assays failed, the antibodies were not specific enough to

permit a valid estimation of the amount of AChE in a drosophila (9.2 ng of AChE in a whole male fly).

Thus, we decided to find a titration agent, *i.e.* an irreversible inhibitor with a high affinity and a good reactivity with the enzyme. To do so, the purified enzyme (30 nM) was incubated with inhibitor for various times (0 to 15 min.) at 25°C. For most inhibitors, kinetics were pseudo-first-order and followed equation 3; k_{is} were estimated using this equation and were found to vary from $7 \text{ l. mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ to $8.2 \cdot 10^5$ (Table 1). But for four compounds, MEPQ, chlorpyrifos-methyl-oxon (ChlM), chlorpyrifos-ethyl-oxon (ChlE) and coumaphos-oxon, the fit on equation 3 was inoperative, the logarithm of remaining activity was not linear with time, the reaction was not pseudo-first-order and the concentration of the enzyme in the solution could not be ignored.

Data obtained for MEPQ, ChlM, ChlE and coumaphos-oxon were then analyzed by multi-non-linear fit to equation 2 (Fig. 1). Fits were operative and $[Eo]$ could be estimated suggesting that these compounds can be used as titrating agents. In figure 1, the plateaus correspond to the amount of remaining free enzyme when all inhibitor molecules have reacted with the enzyme. Thus, knowing the amount of inhibitor added to the solution, we can deduce the concentration of the enzyme.

Deviation from linearity can originate from more complex kinetics as observed with some inhibitors which bind to a peripheral site (Friboulet *et al.*, 1990) or to an increase in the spontaneous dephosphorylation rate as observed with some mutant AChEs (Lockridge *et al.*, 1997). To ascertain that deviation from linearity is due to a second-order rate reaction we increased the insecticide concentration to obtain $[PXo] \gg [Eo]$ and so get pseudo-first-order kinetics by simplification of equation 2 to 3. As the reaction was too fast, we slowed it down by decreasing the incubation temperature to 4°C. In these conditions, the reactions followed a pseudo-first-order kinetics (Fig. 2).

A titration agent must also be specific for the target. As organophosphorous compounds may also react with other esterases, we tested if titrating compounds react with non-specific esterases. We used crude extract of drosophila and analyzed the inhibition of esterases with 4-methyl-umbelliferyl-acetate since purified AChE is devoid of esterase activity when this compound is used as substrate. We did not observe any inhibition of esterase activity with MEPQ or ChlM at concentrations ten-fold higher than those which were used for AChE titration suggesting that these inhibitors did not inhibit esterases other than AChE.

As some other esterases which do not metabolize 4-methyl-umbelliferyl-acetate, may be inhibited by the titrating agent MEPQ, we used another method to ascertain the specificity. We tested if titration is independent of the tissue origin by estimating the proportion of AChE present in the head and in the whole body. The proportion obtained by measuring activity and proportion obtained by MEPQ titration were not significantly different in the various strains (not shown). This suggests that inhibitors were specific for AChE although we can eliminate the hypothesis that another esterase had the same head/whole body distribution as AChE and reacted with the MEPQ.

Test of titrating agents, MEPQ and ChlM with reference strains.

To test if MEPQ and ChlM can be used as titrating agents, several extracts of strain Canton-S were prepared at different concentrations. The estimated amount of AChE was proportional to the activity showing that there was no bias in the estimation of protein amount (Fig.3). This proportionality remained when extracts were prepared from laboratory strains expressing different amounts of wild type AChE (Ace¹²⁶ and ACT-J). These strains have the same AChE as Canton-S, with the same primary structure. Additionally, the titration was un-affected when purified enzyme was used as source of enzyme alone or mixed with crude extracts. Titration was then independent of the extract used, suggesting that it was specific for AChE. Furthermore, titration results were identical whether the inhibitors was MEPQ or ChlM.

AChE amount in field strains

The amounts of AChE in field strains was estimated with MEPQ. A difference of over 20% between two strains was considered significant and not attributable to statistical variations in the measurements. Amounts ranged from 0,9 to 1,9 times reference strain, Canton-S (Fig.4). We did not find any strain with higher amount than two fold the reference strain or lower amount than the reference strain.

Relations between AChE amount and insecticide resistance.

To check if the increased AChE levels are correlated to insecticide resistance in field populations, toxicological tests in 69 of the strains were performed with parathion. Resistance of the fly was estimated by the ratio of LD₅₀ (LD₅₀ of the tested fly / LD₅₀ of Canton S). Figure 5A shows that there is a significant correlation between the amount of AChE and

resistance. This suggests that an increased amount of AChE contributes to resistance in field-collected drosophila strains. The more a strain has been treated in the field, the highest is its resistance to insecticide, and the more resistance mechanisms it has accumulated including an increased amount of AChE.

DISCUSSION

Compounds suitable for titration of AChE in drosophila

Some organophosphates were shown to be very potent. Chlorpyrifos-ethyl-oxon was the most potent, it was recently reported as a good inhibitor of butyrylcholinesterase (Amitai *et al.*, 1998) compared to AChE. As insect AChE metabolizes butyrylcholine with nearly same efficiency as acetylcholine (Gnagey *et al.*, 1987), its potency against insect AChE is consistent. MEPQ presents the advantage of having a fluorescent leaving group allowing AChE to be titrated in two ways: fluorescens generated by the reaction (Levy and Ashani, 1986) or assay of inhibited AChE (Radic *et al.*, 1993). However, the first method was less sensitive and could not be used with crude insect extract, so was only used to check purified enzyme. These inhibitors were specific for AChE compared to esterases or other serine enzymes because (i) we did not find any inhibition of non-specific esterases metabolizing methyl-umbelliferyl acetate (ii) titration was independent of tissue origin and (iii) cumulated addition experiments did not show any deviation in the titration.

Amount of AChE in field strains.

In insects, AChE is only present in the synapses of the central nervous system where it hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine. In some insect, non-cholinergic localization has been reported, but it remains an exception and the total amount of AChE in the fly reflects the amount in the synapses. Here, we did not find any flies with less than 90% of the amount of AChE in the reference strain, suggesting that flies with low amount of AChE were not viable. This is in apparent discrepancy with previous report of flies with only 30% of the Canton-S référence AChE amount (Hoffmann *et al.*, 1992). But these flies were obtained by genetic transformation and rescue, maintained with difficulty in laboratory conditions, and were lost in the years following the transformation. This suggests that if 30 % of wild type amount is just sufficient for life, this low amount affects the fitness of the flies which are even

counterselected in the laboratory as they would be in field conditions. We found flies with up to two-fold the levels of AChE of Canton-S, but never more. We can hypothesize that the AChE activity evolved to metabolize the neurotransmitter not too fast to allow acetylcholine to interact with the receptor and not too slowly to allow repolarisation of the postsynaptic membrane.

Origin of the overproduction of AChE.

Several mechanisms can be responsible for the over-production of a protein such as gene amplification, increased transcription or stability of the transcript, increased translation via augmentation of folding efficiency or over-stabilisation of the protein. Some of these mechanisms have already been described in insecticide-resistant insects. Gene amplification of esterases metabolizing organophosphorous insecticide has been reported in resistant mosquitoes and aphids (Devonshire and Field, 1991) and AChE gene duplication has been evidenced in some mosquito strains (Bourguet *et al.*, 1996). An increase of transcription or of the stability of the transcript has been described for glutathione S-transferase degrading the insecticide (Fournier *et al.*, 1992). Such a modification in transcription or post-transcriptional processes may occur for AChE. But, as the transcript was not very abundant and as the suspected increase reaches at at most two, we did not detect any differences in the amount of mRNA encoding AChE.

Resistance provided by the increase in AChE.

We found a correlation between the levels of AChE and resistance to parathion suggesting that an increase in AChE amount may provide resistance. However, resistance provided by such an increase is weak (Fournier *et al.*, 1992) and cannot entirely explain the resistance observed. Some other mechanisms may be involved and we can hypothesize that AChE increase only participates in the resistance observed. So, the correlation indicates the participation of AChE overproduction but also the history of the strains. Flies from the most heavily insecticide sprayed areas accumulated resistance mechanisms, among them is overproduction of AChE while strains which had had less treatment were poor in resistance mechanisms and did not show AChE overproduction.

One of the several mechanisms of resistance is qualitative modification of AChE. The modified enzyme is less inhibited by insecticide (Smissaert, 1964). In *Drosophila*, several

point mutations have been mapped (Fournier *et al.*, 1992, Mutero *et al.*, 1994). These mutations alone or in combination affect inhibition by the insecticide which is decreased. As insecticides are acetylcholine analogues, they are metabolized like substrate in two main steps. There is first a carbamoylation or phosphorylation of the active serine, this step is analogous of the acetylation by the substrate. The second step is the regeneration of the enzyme via decarbamoylation or dephosphorylation. This step is analogous to the deacetylation which occurs for the acylenzyme, but it is very slow. For a comparison deacetylation is 1000 s^{-1} at pH7 25°C, decarbamoylation is 0.001 s^{-1} and dephosphorylation is still slower. As a consequence, insecticides are often considered as hemisubstrates or inhibitors. This similarity between insecticides and substrate has a consequence since every mutation in the active site, modifying insecticide hydrolysis, concomitantly modifies substrate hydrolysis. As a consequence, resistance usually correlates with a decrease in acetylcholine hydrolysis which may affect the fitness of the insect. Thus we can consider that overproduction of AChE, by restoring the fitness of the insect, may also be a modifier of the qualitative modifications of the same enzyme.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tom Wilson (Colorado State Univ.), Eric Bonnivard (Univ. Paris 6), Philip Daborn (Melbourne Univ.) and Robert Delorme (INRA, Versailles) for providing drosophila strains. This work has been supported by CNRS (GDR 1105) and genome project (INRA).

REFERENCES

- Amitai, G., Moorad, D., Adani R. and Doctor, B.P. (1998) *Biochem. Pharmacol.* **56**, 293-299
- Berrada, S and Fournier, D. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **256**, 348-354.
- Bourguet, D., Raymond, M., Bisset, J.A., Pasteur, N. and Arpagaus, M. (1996) *Biochem. Genet.* **34**, 351-362.
- Cochrane B.J., Windelspecht M. and Brandon S.E. (1997) *Resistant Pest Management* **9**, 17-19.
- Devonshire A.L. and Field, L.M. (1991) *Ann. Rev. Entomol.* **36**, 1-23.
- Ellman, G. L., Courtney, K.D., Andres, K.D. and Featherstone, R.M. (1961) *Biochem. Pharmac.* **7**, 88-95.

- Estrada-Mondaca, S. and Fournier, D. (1998) *Prot. Exp. Purif.* **12**, 166-172.
- Feyereisen, R. (1995) *Toxicol. L.* **82/83**, 83-90.
- Fournier, D., Bride, J.M., Karch, F. and Bergé J.B. (1988) *FEBS L.* **238**, 333-337.
- Fournier, D., Bride, J.M., Hoffmann, F. and Karch, F. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 14270-14274.
- Fournier, D. and Mutero, A. (1994) *Comp. Biochem. Physiol.* **108C**, 19-31.
- Friboulet, A., Rieger F., Goudou D., Amitai G. and Taylor P. (1990) *Biochemistry* **29**, 914-920.
- Gnagey, A., Forte, M. and Rosenberry, T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13290-13298.
- Hall, J.C. and Kankel, D.R. (1976) *Genetics* **83**, 517-535.
- Hoffmann, F., Fournier D. and Spierer, P. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 17-22.
- Levy, D. and Ashani, Y. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1079-1085.
- Lockridge., O., Blong, R.M., Masson, P., Froment, M.-T., Millard, C.B. and Broomfield, A. (1997) *Biochemistry* **36**, 786-795.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. and Fournier, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5922-5926.
- Pralavario M. and Fournier D. (1992) *Biochem. Genet.* **30**, 77-83.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S. and Taylor, P. (1993) *Biochemistry* **32**, 12074-12084.
- Raymond, M., Heckel, D. and Scott, J.G. (1989) *Genetics* **123**, 543-551.
- Smissaert H.R., (1964). *Science* **143**, 129-131.
- Smissaert, H. R., Abd El Hamid, F.M. and Overmeer, W.P.J. (1975) *Biochem. Pharmac.* **24**, 1043-1047.
- Tripathi, R. K., and O'Brien, R. D. (1973) *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 495-498.
- Voss, G. (1980) *J. Econ. Ent.* **73**, 189-192.
- Zhu, K.Y., Lee, S.H. and Clark J.M. (1996) *Pest. Biochem. Physiol.* **55**, 100-108.

Figure legends

Figure 1: Inhibition of 30 nM drosophila AChE by MEPQ, ChlE and coumaphos-oxon at 25°C. The curves were obtained by fitting data to equation 3.

Figure 2: Inhibition of drosophila AChE by MEPQ and ChlM at 5°C.

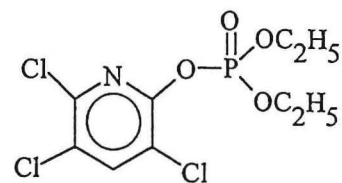
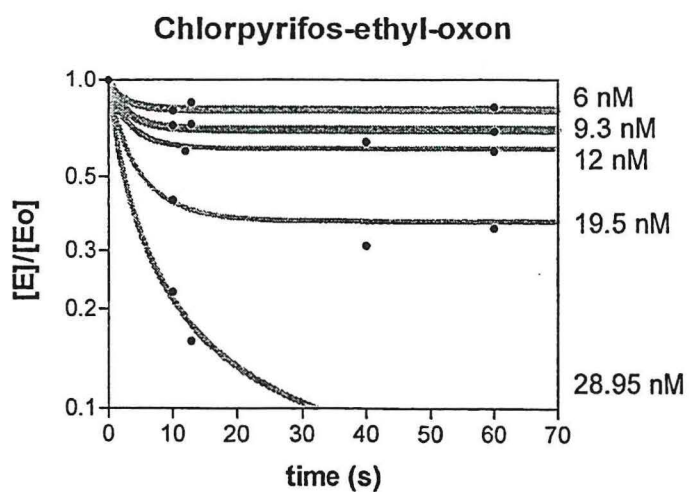
Figure 3: Relationship between acetylcholinesterase activity and AChE amount determined by titration with MEPQ and ChlM. Extracts were prepared from different sources and used either alone or in combination.

Figure 4 : Distribution of strains with respect to the relative amount of AChE per individual.

Figure 5: Relationship between amount of AChE and insecticide resistance in field populations.

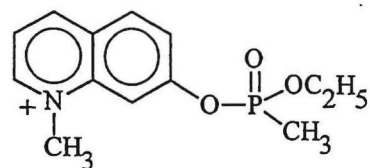
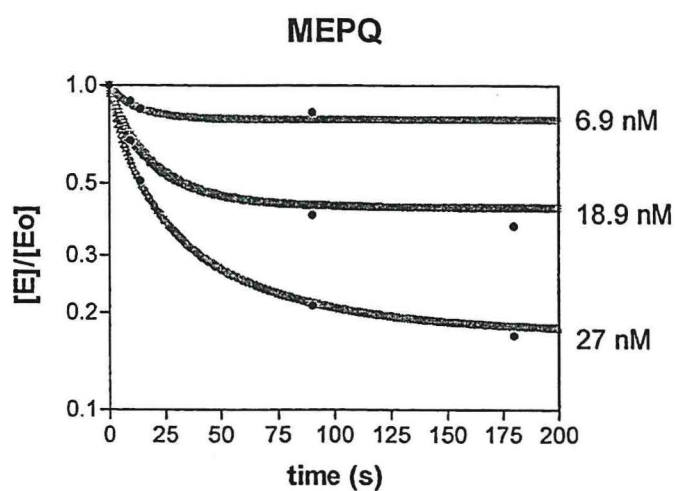
Table 1 : Inhibition of purified AChE by irreversible inhibitors. k_i : bimolecular rate constant in $\text{l. mol}^{-1}.\text{sec}^{-1}$.

Inhibitor	k_i
chlorpyrifos-ethyl-oxon	$1.44 \cdot 10^{+7}$
chlorpyrifos-methyl-oxon	$8.30 \cdot 10^{+6}$
MEPQ	$2.90 \cdot 10^{+6}$
coumaphos-oxon	$9.88 \cdot 10^{+5}$
eserine	$8.17 \cdot 10^{+5}$
azametiphos	$5.44 \cdot 10^{+5}$
DFP	$5.33 \cdot 10^{+5}$
azinphos-methyl-oxon	$2.57 \cdot 10^{+5}$
triazamate	$2.13 \cdot 10^{+5}$
carbofuran	$8.94 \cdot 10^{+4}$
naled	$6.30 \cdot 10^{+4}$
malaoxon	$4.47 \cdot 10^{+4}$
paraoxon-ethyl	$2.75 \cdot 10^{+4}$
oxamyl	$1.48 \cdot 10^{+4}$
propoxur	$1.41 \cdot 10^{+4}$
cis-chlorfenvenphos	$8.79 \cdot 10^{+3}$
dichlorvos	$8.15 \cdot 10^{+3}$
methiocarbe	$7.25 \cdot 10^{+3}$
paraoxon-methyl	$6.59 \cdot 10^{+3}$
pirimicarb	$3.83 \cdot 10^{+3}$
vamidothion	$3.62 \cdot 10^{+3}$
carbaryl	$3.12 \cdot 10^{+3}$
fenitrothion-oxon	$2.51 \cdot 10^{+3}$
heptenophos	$2.19 \cdot 10^{+3}$
methomyl	$1.51 \cdot 10^{+3}$
thiofanox	$1.47 \cdot 10^{+3}$
demethon-S	$6.72 \cdot 10^{+2}$
profenofos	$4.52 \cdot 10^{+2}$
demethon-S-methyl	$4.45 \cdot 10^{+2}$
dimethoate-oxon	$3.62 \cdot 10^{+2}$
metolcarb	$1.68 \cdot 10^{+2}$
iso-OMPA	$1.39 \cdot 10^{+2}$
aldicarb	$1.07 \cdot 10^{+2}$
benfuracarb	$5.46 \cdot 10^{+1}$
butocarboxim	7.09



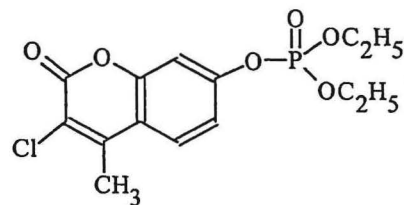
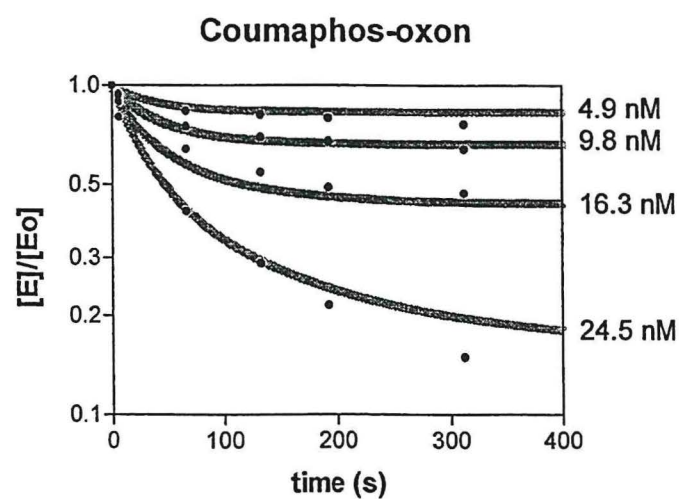
$$k_i = 1.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} (+/- 0.4)$$

$$[E_o] = 30.8 \text{ nM} (+/- 1.3)$$



$$k_i = 2.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} (+/- 0.7)$$

$$[E_o] = 32.7 \text{ nM} (+/- 2.1)$$



$$k_i = 9.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} (+/- 2)$$

$$[E_o] = 28.9 \text{ nM} (+/- 2.1)$$

Figure 1

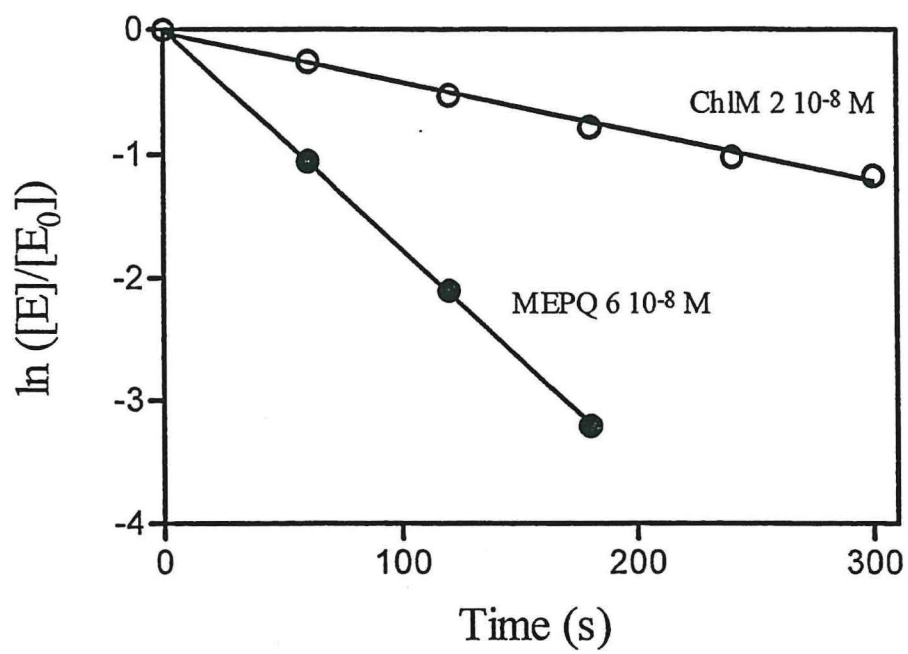
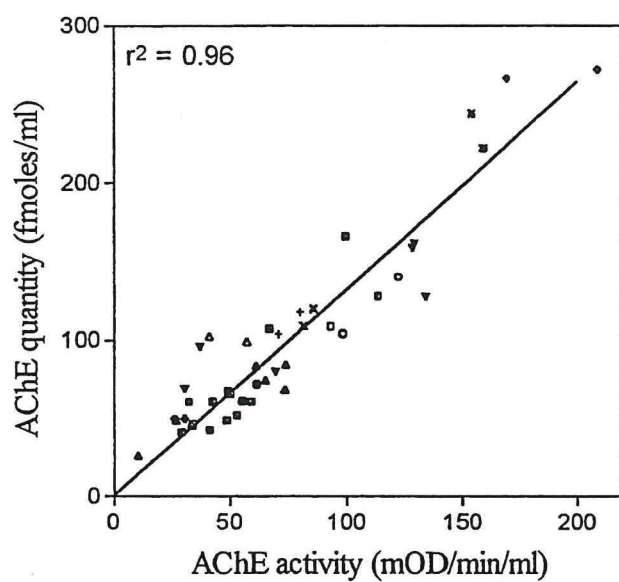


Figure 2



- Canton-S (MEPQ)
- ▲ purified enzyme (MEPQ)
- ▼ ACT-J (MEPQ)
- Acel²⁶ (MEPQ)
- Canton-S + purified enzyme (MEPQ)
- ◻ Canton-S + ACT-J (MEPQ)
- △ Canton-S (ChIM)
- ▼ Acel²⁶ (ChIM)
- ACT-J (ChIM)
- purified enzyme (ChIM)
- × Canton-S + purified enzyme (ChIM)
- + Acel²⁶ + purified enzyme (ChIM)
- ACT-J + purified enzyme (ChIM)

Figure 3

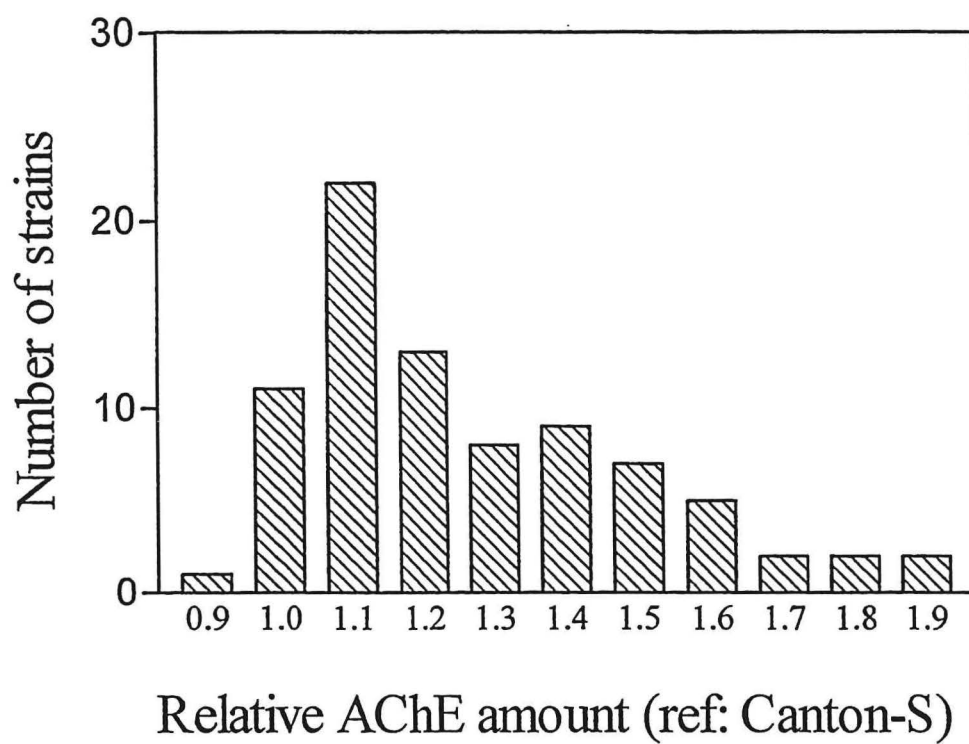


Figure 4

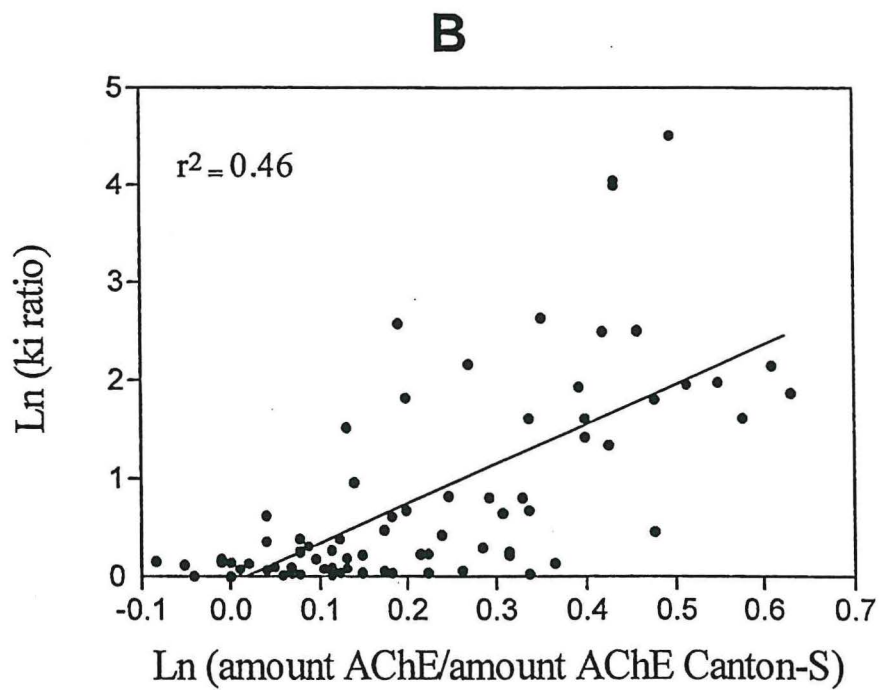
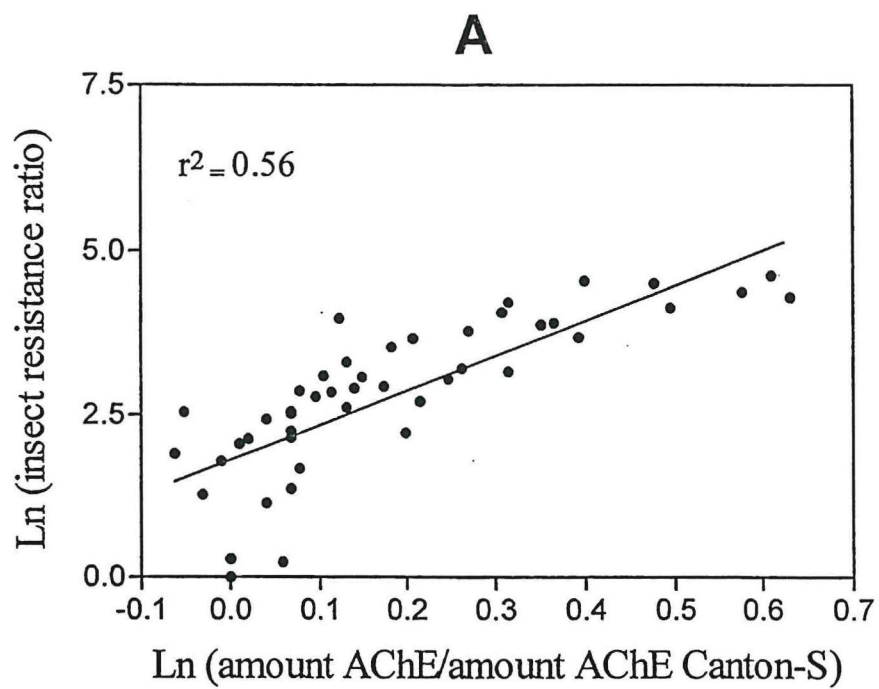


Figure 5

D. MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DE MUTATIONS DANS LA
RESISTANCE AUX INSECTICIDES DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DE
DROSOPHILA MELANOGASTER MODIFIEE IN VITRO

Publication 2: A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. Villatte F., Ziliani P., Marcel V., Menozzi P., Fournier D.. Acceptée dans *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

Dans les populations naturelles d'insectes, huit mutations ponctuelles impliquées dans la résistance aux insecticides ont été identifiées dans le gène codant pour l'AChE: sept concernent les diptères *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica* et une concerne un coléoptère (le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*). Ces mutations doivent modifier la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Au niveau du site actif, il en résulterait une modification dans l'orientation des insecticides, analogues du substrat de l'enzyme, de telle manière que l'attaque de l'insecticide par la sérine catalytique soit moins efficace.

Le faible du nombre des mutations impliquées dans la résistance nous a conduit à émettre l'hypothèse qu'il pouvait exister d'autres mutations. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps généré des mutations sur le gène codant pour l'AChE de drosophile puis exprimé *in vitro* les enzymes correspondantes. L'activité de ces enzymes a été mesurée en présence de différents insecticides. De plus, la métabolisation du substrat naturel de l'enzyme par les enzymes modifiées a été mesurée à trois concentrations différentes de substrat dans le but de vérifier si les mutations pouvaient exister dans les populations naturelles.

28 mutations ont été générées: 9 à la position 199, 8 à la position 368 et 11 à des positions importantes pour le fonctionnement de l'enzyme.

Par rapport à l'enzyme de la souche de référence Canton - S, sensible aux insecticides, 18 enzymes possédant les mutations suivantes se sont révélées résistantes: I199W, I199R, I199E, I199V et I199T(présentes dans les populations naturelles), I199A, I199G, F368W, F368Y (présente dans les populations naturelles), F368I, F368V, F368C, F368S, F368G,

Y109K, E275G, E275Q, F409G. Ces mutations représentent 64% des mutations créées par mutagenèse. 3 mutations (E107Y, Y408F, Y412A), soit 11% des mutations, ont conduit à une sensibilité accrue et 7 mutations (soit 25%) n'ont aucun effet vis à vis des insecticides testés. Cela suggère qu'une mutation au hasard aurait plus de chances d'engendrer une résistance plutôt qu'une sensibilité accrue. Ce résultat expliquerait pourquoi un grand nombre d'espèces d'arthropodes sont aujourd'hui résistantes par mutations au sein de l'AChE.

Ces résultats ont été obtenus en mesurant l'activité des enzymes modifiées en présence de différents insecticides. La plupart des mutations conduisent globalement à la résistance mais il a été observé des cas de résistance croisée négative. C'est notamment le cas de l'enzyme portant la mutation F368S: la sensibilité de celle-ci est accrue avec le naled (organo-phosphoré) alors qu'elle est insensible au propoxur et au carbofuran, deux carbamates. Ainsi, la nature de l'insecticide utilisé dans les programmes de lutte pourra influencer sur la sélection de la mutation impliquée dans la résistance.

Les 18 mutations impliquées dans la résistance *in vitro*, peuvent-elles engendrer la résistance *in vivo* ? L'activité des enzymes modifiées a été mesurée pour trois concentrations de substrat (acétylthiocholine). Si l'on prend en considération le fait que 25% de l'activité de l'AChE totale est suffisante pour permettre à la drosophile de survivre (Hoffmann *et al.*, 1992), 15 mutations donneraient des enzymes permettant à l'insecte d'être viable.

Ce nombre élevé de mutations impliquées dans la résistance laisse supposer qu'il doit exister dans les conditions naturelles potentiellement plus de mutations que les huit déjà identifiées.

Publication 2, acceptée dans *Pesticide Biochemistry and Physiology*:

A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. Villatte F., Ziliani P., Marcel V., Menozzi P., Fournier D..

A HIGH NUMBER OF MUTATIONS IN INSECT ACETYLCHOLINESTERASE MAY PROVIDE INSECTICIDE- RESISTANCE

running title: mutations in acetylcholinesterase

François Villatte*, Philippe Ziliani, Véronique Marcel, Philippe Menozzi
and Didier Fournier

*Laboratoire d'Entomologie Appliquée, Université Paul Sabatier, 118 route de
Narbonne, 31062 Toulouse cedex , France*

*
*To whom correspondence should be addressed: Institute For Technical
Biochemistry, Allmandring 31, Stuttgart University, 70569 Stuttgart, Germany,
E-mail: Francois.Villatte@po.uni-stuttgart.de*

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; ATCh, acetylthiocholine. GABA,
γ-amino-butyric acid.

Numbers in brackets correspond to Torpedo numbering.

ABSTRACT

Many insect pest species have developed insecticide-resistance through modifications of acetylcholinesterase. Seven mutations, issued from one nucleotide change, have been associated with resistance in natural populations of drosophila and housefly : F115(78)S, I199(129)V, I199(129)T, V220(150)L, G303(227)A, F368(290)Y and G406(328)A. In order to study the number of mutations which can lead to resistance, we first analysed the effects of a set of amino acid replacements in the drosophila acetylcholinesterase on inhibition by several carbamate and organophosphate insecticides. It appeared that most of mutations resulted in insecticide-resistance. Second, we investigated the effect of mutations leading to resistance on substrate metabolization. We found that most of the mutations retained enough activity to allow the life of insect. These data suggest that the number of insecticide-resistance mutations in acetylcholinesterase may be well above seven.

INTRODUCTION

Several mechanisms underlie resistance to insecticides in arthropods. First, there is a decrease of insecticide penetration through the cuticle (Ku and Bishop, 1967). Second, resistance can originate from an increase of detoxification through gene amplification (Mouches *et al.*, 1986; Field *et al.*, 1988), overtranscription (Fournier *et al.*, 1992a) or point mutation in the enzyme (Newcomb *et al.*, 1997). Thirdly, resistance can be due to target modification. There are only three target sites for most insecticides: γ -amino-butyric acid (GABA) receptor is the target of cyclodiene insecticides, the voltage-dependent sodium channel is the target site for DDT and pyrethroids and acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is quasi-irreversibly inhibited by organophosphorus and carbamate compounds, which are substrate analogues. A decrease in target sensitivity due to point mutations has been described for the three targets (Fournier *et al.*, 1992b, French-Constant *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1996), these mutations sometimes recombine in the same gene, leading to highly resistant proteins (Mutero *et al.*, 1994a). Modification of target expression may also result in insecticide resistance: underexpression or overexpression may be involved depending on the target, as for example for sodium channel or AChE (Kasbekar and Hall, 1988; Fournier *et al.*, 1992b). Additionally, we recently showed that a decrease of the physiological relevance of the target may also result in resistance: flies with a decrease of synthesis of acetylcholine are resistant to organophosphorous compounds since less AChE is useful to metabolize the neurotransmitter (Bourguet *et al.*, 1997).

Pest resistance management needs methods to detect resistance genes in order to know the proportion of resistant insects in field populations. To detect point mutations, several methods have been developed and the PCR-based Amplification of Specific Allele, (PASA, Sommer, 1992) improved by Zhu *et al.* (1996) has gained in interest because it is easy to use. This method has been developed to detect GABA receptor mutations in insects (ffrench-Constant and Steichen, 1994; Aronstein *et al.*, 1995). In that case, the number of mutations seems to be very limited: only two have been found over eight insect species. This low number of mutations allowed to apply the PASA technique which requires the knowledge of all the mutations involved in the resistance. Without this prerequisite, the technique could lead to an under-estimation of the proportion of resistant insects.

By contrast, AChE resistance to insecticides was associated to 7 amino acid replacements in only four resistant strains of *Drosophila melanogaster* and three resistant strains of *Musca domestica* (Feyereisen, 1995 for review). Furthermore, mutations *in vitro* at one other position in the *Drosophila* AChE active site resulted also in a decreased sensitivity of the enzyme (Mutero *et al.*, 1992). These data suggest that many mutations may be involved in resistance. To test this hypothesis we generated 28 mutations in *Drosophila* AChE and studied their influence on the hydrolysis of several carbamate and organophosphate insecticides, as well as acetylthiocholine.

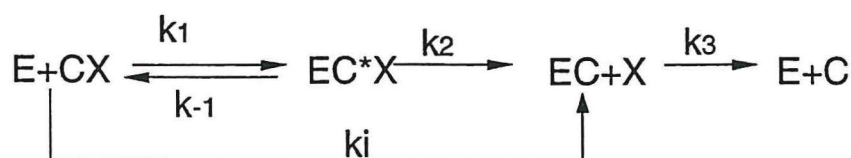
MATERIALS AND METHODS

Mutagenesis, production and purification of recombinant proteins

Mutagenesis was performed according to Kunkel (1985) and proteins were produced in baculovirus-infected cells, purified and stabilised according to Estrada-Mondaca and Fournier (1998). Briefly, hydrophilic proteins were produced by cloning a cDNA truncated at the 3' end, devoid of the C-terminal hydrophobic peptide which is exchanged for a glycolipid anchor in the mature protein. AChEs were secreted in the culture medium and purified by affinity chromatography followed by diafiltration. As *Drosophila* AChE is not stable when diluted, 1 mg/ml bovine serum albumin was added to the samples.

Kinetics

Kinetic analysis were performed at 25°C in 25 mM phosphate buffer pH 7.0 with 10-100 ng of enzyme. The rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide esters was followed at 412 nm, using the method of Ellman *et al.* (1961) with 10, 100 and 1000 μ M of substrate. Active site titration was performed with 7-(methylethoxyphosphinyloxy)1-methyl-quinolinium iodide according to Levy and Ashani (1986). k_{obs} , (nmoles of product released per sec and nmole of enzyme) was calculated for each enzyme. A generally accepted inhibition mechanism of AChE by carbamate or organophosphorus compounds was described by Aldridge (1950):



with E = enzyme, CX = carbamate or organophosphate compound, X = leaving group and C = remaining group. To estimate the carbamylation or phosphorylation rate constants (k_i), the enzymes were incubated for various times with different insecticide concentrations with [I] at least ten-fold higher than [E] in 25 mM phosphate buffer pH7 at 25 °C. The variation of the concentration of the free enzyme [E] with time was estimated by recording the remaining activity following dilution using acetylthiocholine as substrate. This variation followed pseudo-first order kinetics, $\ln [E]/[E_0] = -k_i [I]t$ where t represents the time of incubation and I the inhibitor since all graphs obtained for each inhibitor and mutated protein were linear, whatever the variable, [I] or t. This suggests that dephosphorylation or decarbamylation (k_3) remained negligible over the duration of the experiment (20 min).

The resistance ratio (RR) for each enzyme and each insecticide is the ratio (k_i wild type / k_i mutant) and the average resistance ratio (mean) was calculated in logarithm scale using the formula:

$$\text{mean} = e^{\left(\frac{\sum \ln(RR)}{n} \right)}$$

where n corresponds to the number of k_i s calculated.

RESULTS

Nine enzymes mutated at position 368 and eight at position 199 were obtained. Tables 1 and 2 show the resistance levels of these enzyme as ratios of k_{is} (k_i wild type / k_i mutant). Value of over 1 indicates that the mutation provided resistance and value under 1 indicates that the mutation led to an increase in sensitivity. Most of mutations provided resistance to most of insecticides. Analysis of average resistance ratio (mean) showed that 14 mutated enzymes out of 17 were insecticide-resistant. The variance of the resistance ratios reflects high differences in resistance towards the different insecticides: a low variance shows that some mutations led to a similar sensitivity to all compounds and a high variance reflects high resistance to some insecticides and/or high sensitivity to others. Thus, the variance corresponding to resistance levels caused by F368Y was low, showing that this mutation triggered the same resistance to all compounds. Conversely, the variance corresponding to the mutation F368S was high and owed to a great sensitivity to molecules such as cis-chlorfenvinfos and high resistance to other inhibitors such as propoxur.

We engineered 11 enzymes carrying amino acid replacements at various positions lining the active site gorge. These positions are (or are suspected to be) important for the enzymatic hydrolysis or the enzyme inhibition: for example W121 is the main part of the "anionic" site, binding the choline part of the acetylcholine. These positions are different from insecticide-resistance positions found in resistant insects. Their level of sensitivity to 6 insecticides led by these mutations were

determined: 4 proteins were resistant compared to the wild type, 3 were more sensitive and 4 displayed similar sensitivity (Table 3).

Each of these mutated protein was tested for its rate of acetylthiocholine hydrolysis at three substrate concentrations (10, 100 and 1000 μ M). Table 4 shows the percentage of wild type hydrolysis rate : most of mutations decreased enzyme activity. If we consider that less than 25% wild type activity is lethal for the insect (Hoffmann *et al.*, 1992), two mutations (Y109K and E275G) displayed an activity that is too low to allow normal development of the fly. Six mutations (F368V, F368C, F368S, F368G, Y408A and F409G) drastically affect the substrate hydrolysis. The other 14 mutations would not affect the viability of the flies. Note that the three mutations found in natural population (I199V, I199T and F368Y) belong to this last group.

DISCUSSION

Seven mutations have been found in AChE from insecticide-resistant strains of *D. melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994) and *Musca domestica* (Devonshire *et al.*, 1998). In order to investigate the number of point mutations able to lead to insecticide resistance, we generated a set of mutations in the drosophila AChE at positions 199 and 368. Mutations at these positions have been found in natural populations of *D. melanogaster*. The analysis of sensitivity of these enzymes to several carbamate and organophosphate insecticides showed that 82% of amino acid replacements led to resistance. We also engineered several proteins mutated at

various positions that have not yet been found mutated in resistant insects. It appeared that most of these mutations led to insecticide-resistance.

As some replacements can drastically affect substrate metabolization, we also investigated the activity of the resistant mutants at substrate concentrations found in the synapse (Nishi *et al.*, 1967). The minimum hydrolytic activity toward acetylthiocholine allowing a complete development of the fly has been shown to be 25% of the wild type activity (Hoffmann *et al.*, 1992). It appeared that some mutations, such as E275G, altered the substrate metabolization too drastically to be selected in resistant insects. But 84% of the resistant enzymes analysed still led to an activity higher than 25% of the wild type. Consequently, the overall number of amino acid replacements leading to a decrease of AChE sensitivity may be well above than seven.

One may notice that the effect of each mutation on the resistance pattern may also be important in the local selection process. Examination of the variance of sensitivity levels showed that the selection of some mutated AChEs can be greatly influenced by the compound used. For example, the F368S mutant could be selected by treatments using propoxur but not naled. By contrast, the selection of some other mutated enzymes could occur whatever the compound used such as the F368Y mutant. Consequently, the local history of pesticides treatments may account for the selection of resistance mutations. Some other factors may also influence mutations selection, as the effect on the folding of the protein (Mutero *et al.*, 1994b).

This number of potential mutations in AChE contrasts with the very restricted number found in resistance to cyclodienes : only 2 mutations have been found in

the GABA receptor over 8 insect species. This apparently astonishing observation could be explained by the binding sites of insecticides on the two proteins. As cyclodienes do not bind on the same site as GABA on the receptor, it is possible to select a GABA-receptor that carries a mutation suppressing the binding of cyclodienes without drastically affecting the binding of the GABA (ffrench-Constant *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). Conversely, carbamates and organophosphates are substrate analogues and bind at the same site as acetylcholine on AChE. Thus, every mutation affecting insecticide binding or metabolism would also affect substrate hydrolysis, thus it is not possible to totally suppress insecticide binding without suppressing substrate hydrolysis. As a consequence, to be selected, a mutation of AChE have to decrease the binding of one ligand (the insecticide) without dramatically decreasing the metabolism of another ligand (the neurotransmitter). Thus, the specificity of the active site of resistant AChEs is increased by modification of residues at several positions around the substrate molecule.

This large number of mutations which can provide resistance suggests that it is necessary to sequence the *Ace* gene from other resistant strains to know most of amino acid replacements leading to resistance before using PASA methods to detect resistant insects in fields.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sopra for providing profenofos and pirimicarb, Cyanamid Agro for the gift of triazamate and Frédéric Magné for excellent technical assistance. This study was supported by INRA (genome project) and CNRS (GDR 1105).

REFERENCES

- W. N. Aldridge, Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues, *Biochem. J.* **46**, 451 (1950).
- K. O. Aronstein and R.H. ffrench-Constant, PCR-based monitoring of specific *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) cyclodiene resistance alleles in the presence and absence of selection, *Bull. Ent. Res.* **85**, 5 (1995).
- D. Bourguet, M. Raymond, S. Berrada, and D. Fournier, Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase: hypothesis of two interacting enzymes for insecticide resistance, *Pest. Sci.* **51**, 276 (1997).
- G.L. Ellman, K.D Courtney, V. Anres, and R.M. Featherstone A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- S. Estrada-Mondaca and D. Fournier, Stabilisation of recombinant drosophila acetylcholinesterase, *Prot. Exp. Purif.* **12**, 166 (1998).

- R. Feyeiresen, Molecular biology of insecticide-resistance, *Tox. Letters* **82/83**, 83 (1995).
- L.M. Field, A.L. Devonshire, and B.G Forde, Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene, *Biochem. J.* **251**, 309 (1988).
- R.H. ffrench-Constant, T.A. Rocheleau, J.C. Steichen, and A.E. Chalmers, A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance, *Nature* **363**, 449 (1993).
- R.H. ffrench-Constant, and J.C. Steichen, A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), *Bull. Ent. Res.* **84**, 11 (1994).
- D. Fournier, J.M. Bride, M. Poirie, J.B. Bergé, and F.W. Plapp, Insect glutathione transferase. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides, *J. Biol. Chem.* **267**, 1840 (1992a).
- D. Fournier, J.M. Bride, F. Hoffmann, and F. Karch, Two types of modifications confer resistance to insecticides, *J. Biol. Chem.* **267**, 14270 (1992b).
- F. Hoffmann., D. Fournier and P. Spierer, Minigene rescues acetylcholinesterase lethal mutations in *Drosophila melanogaste*,. *J. Mol. Biol.* **223**, 17 (1992).
- T.Y. Ku, and J.L. Bishop, Penetration, excretion and metabolism of carbaryl in susceptible and resistant German cockroaches, *J. Econ. Entomol.* **60**, 1328 (1967).
- D.P. Kasbekar, and L.M. Hall, A drosophila mutation that reduces sodium channel number confers resistance to pyethroid insecticides, *Pest. Biochem. Physiol.* **32**, 135 (1988).

- T.A. Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 488 (1985).
- D. Levy and Y. Ashani, Synthesis and *in vivo* properties of a powerful quaternary methylphosphonate inhibitor of acetylcholinesterase, *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1079 (1986).
- H.J. Lee, T. Rocheleau, H.G. Zhang, M.B. Jackson, and R.H. ffrench-Constant, Functional expression of insecticide susceptible and resistant GABA receptors from the cyclodiene resistance gene *Rdl*, *FEBS Let.* **335**, 315 (1993)
- R.D. Newcomb, P.M. Campbell, D.L. Ollis, E. Cheah, R.J. Russell, and J.G. Oakeshott, A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorous hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7464 (1997).
- S. Nishi, H. Soeda, and K. Kohetsu, Release of acetylcholine from sympathetic preganglionic nerve terminals, *J. Neurophysiol.* **30**, 114 (1967).
- C. Mouches, N. Pasteur, J.B. Bergé, O. Hyrien, M. Raymond, B.R. de Saint Vincent, M. de Silvestri, and G.P. Georghiou, Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito, *Science* **233**, 778 (1986).
- A. Mutero, M. Pralavorio, V. Simeon, and D. Fournier, Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein, *Neuroreport* **3**, 39 (1992).
- A. Mutero, M. Pralavorio, J.M. Bride, and D. Fournier, Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5922 (1994a).

- A. Mutero, J.M. Bride, M. Pralavorio, and D. Fournier, *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase: identification and expression of two mutations responsible for cold and heat-sensitive phenotypes, *Mol. Gen. Genet.* **243**, 699 (1994b).
- S.S. Sommer, PCR amplification of specific alleles, *Science* **255**, 514 (1992).
- M.S. Williamson, D. Martinez-Torres, C.A. Hick, and A.L. Devonshire, Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides, *Mol. Gen. Genet.* **252**, 51 (1996).
- K.Y. Zhu and M. Clark, Addition of a competitive primer can dramatically improve the specificity of PCR amplification of specific allele, *BioTechniques* **21**, 586 (1996).

Table 1. Resistance ratio (ki wild type/ ki mutant) conferred by mutations at position 199(129). Number in brackets corresponds to Torpedo numbering. Mean : average resistance ratio. (SE).

Compound	I199W	I199R	I199K	I199E	I199V	I199T	I199A	I199G
malaoxon	3.5 (1)	5 (1)	1.8 (0.1)	5.8 (0.5)	8.1 (1.1)	4.3 (0.4)	5.5 (0.9)	3.2 (0.4)
dichlorvos	0.7 (0.1)	1.2 (0.2)	1.2 (0.1)	0.6 (0.1)	1.4 (0.2)	1.0 (0.1)	1.0 (0.1)	0.9 (0.1)
ethyl paraoxon	2.2 (0.2)	1.6 (0.3)	1.0 (0.1)	2.5 (0.4)	3.0 (0.3)	2.3 (0.3)	2.5 (0.2)	2.0 (0.2)
propoxur	18 (3)	1.2 (0.1)	0.86 (0.03)	1.2 (0.1)	1.6 (0.1)	0.5 (0.2)	3.6 (1)	2.0 (0.1)
carbofuran	35 (1)	1(0.3)	0.43 (0.04)	0.4 (0.1)	0.6 (0.2)	3.0 (0.4)	0.5 (0.1)	0.8 (0.1)
carbaryl	11 (2)	2.5 (1)	0.54 (0.04)	2.5 (1)	2.3 (0.6)	1.7 (0.4)	2.2 (0.1)	3.4 (0.7)
pirimicarb	66 (6)	1.8 (0.3)	1.5 (0.1)	3.4 (0.5)	1.5 (0.1)	1.7 (0.7)	3.4 (0.8)	3.7 (0.4)
mean	8.2*	1.7*	1	1.7*	2*	1.7*	2*	2*
variance	13.6	1.3	1.3	2.5	1.8	1.6	2	1.5

* significant difference.

Table 2. Resistance ratio (ki wild type/ ki mutant) conferred by mutations at position 368(290)

Number in brackets corresponds to Torpedo numbering. Mean : average resistance ratio. (SE).

Compound	F368W	F368Y	F368H	F368I	F368L	F368V	F368C	F368S	F368G
azinphos methyl oxon	5.7 (0.1)	0.98 (0.1)	1.0 (0.1)	0.8 (0.5)	0.28 (0.07)	1.9 (0.1)	0.75	1.2 (0.1)	1.0 (0.1)
vamidothion	25 (4)	1.6 (0.1)	1.7 (0.3)	9 (3)	3.0 (0.1)	3.6 (0.6)	19 (2)	33 (9)	47 (11)
methyl paraoxon	22.3 (0.5)	2.5 (0.6)	1.6 (0.1)	0.8 (0.2)	0.23 (0.01)	3.4 (1.2)	1.4 (0.2)	6.0 (0.3)	3.0 (1.5)
malaaxon	16 (1)	4 (1)	0.74 (0.04)	0.42 (0.05)	0.4 (0.1)	3.4 (0.4)	2.0 (0.7)	5 (2)	9 (2)
naled	24 (6)	2.4 (0.1)	0.89 (0.01)	0.23 (0.06)	0.10 (0.01)	1.3 (0.1)	0.16	0.8 (0.1)	1.2 (0.1)
dichlorvos	11 (3)	3 (1)	1.6 (0.1)	2.7 (0.1)	0.37 (0.08)	3.8 (1)	5.0 (0.2)	9 (2)	12 (2)
cis-chlorfenvenfos	53 (9)	5 (1)	1.4 (0.3)	0.41 (0.01)	0.27 (0.01)	12 (3)	0.9 (0.1)	0.4 (0.2)	1.2 (0.2)
profenofos	18 (7)	2 (0.3)	3.4 (0.4)	1.4 (0.3)	0.20 (0.02)	3.5 (0.1)	1.8 (0.1)	1.1 (0.2)	1.0 (0.1)
ethyl paraoxon	15 (2)	1.5 (0.2)	1.3 (0.6)	1.0 (0.1)	0.44 (0.04)	11 (4)	5.0 (1.6)	3.4 (0.5)	3.2 (1.2)
propoxur	20 (6)	3.4 (0.4)	0.7 (0.1)	5 (1)	11.7 (0.4)	5.2 (0.1)	145 (14)	110 (35)	104 (14)
carbofuran	3.5 (0.1)	1.8 (0.1)	12 (2)	18 (1)	8 (1)	110 (15)	18 (1)	104 (32)	4.4 (0.4)
oxamyl	12.6 (0.4)	1.2 (0.1)	0.6 (0.2)	3.4 (0.1)	1.0 (0.1)	9 (2)	8.4 (1.5)	4.8 (0.3)	5.6 (2.5)
butocarboxim	1.3 (0.1)	1.0 (0.1)	0.8 (0.1)	4.2 (0.2)	1.0 (0.1)	5.2 (0.6)	1.4 (0.1)	3.6 (0.2)	23 (1)
metolcarb	2.0 (0.1)	1.7 (0.1)	0.8 (0.2)	2.5 (0.1)	3.4 (0.7)	4.0 (0.1)	4 (1)	3.3 (0.7)	3.7 (0.6)
carbaryl	1.8 (0.1)	1.7 (0.6)	0.5 (0.2)	16 (1)	10 (6)	3.7 (0.6)	26 (1)	73 (21)	36 (12)
thiofanox	5.6 (2.2)	4.7 (1.5)	6 (2)	14.4 (1.6)	13 (3)	47 (4)	15.0 (0.5)	66 (8)	17 (2)
methomyl	13.0 (0.5)	1.3 (0.1)	0.6 (0.4)	1.5 (0.1)	0.8 (0.1)	5.0 (0.2)	6 (1)	6.4 (0.9)	3.0 (0.2)
pirimicarb	71 (22)	3.9 (0.6)	1.0 (0.1)	4.3 (1.7)	0.8 (0.1)	15 (5)	9 (2)	58 (17)	340 (127)
triazamate	4.6 (0.6)	4.6 (0.9)	10 (1)	2.6 (0.5)	0.60 (0.02)	25.5 (0.5)	15.0 (0.3)	5.9 (0.5)	5.3 (0.2)
mean	10.3*	2.2*	1.4	2.3*	1.0	7*	4.8*	7.7*	7.6*
variance	3.5	1.3	2.4	5	9.8	3.4	11.6	18	14

*significant difference

Table 3. Resistance ratio (ki wild type/ ki mutant) conferred by mutations at positions not found mutated in natural populations
Number in brackets corresponds to Torpedo numbering. Mean : average resistance ratio. (SE).

Compound	E107(70)Y	Y109(72)K	W121(84)A	E275(199)G	E275(199)Q	L366(288)F	W359(279)L	Y408(330)A	Y408(330)F	F409(331)G	Y412(334)A
malaoxon	0.10 (0.01)	2.4 (0.5)	0.54 (0.03)	21 (2)	7 (1)	0.8 (0.2)	1.6 (0.5)	1.0 (0.1)	0.3 (0.02)	1.8 (0.1)	0.19 (0.05)
ethyl paraoxon	0.27 (0.06)	1.66 (0.02)	0.7 (0.1)	5 (1)	39 (6)	0.29 (0.03)	2.0 (0.6)	1.3 (0.2)	0.45 (0.1)	0.38 (0.02)	0.25 (0.03)
methyl paraoxon	0.35 (0.04)	1.6 (0.5)	7 (3)	2.3 (0.5)	27 (4)	0.8 (1.22)	0.6 (0.3)	1.0 (0.4)	0.25 (0.01)	1.8 (0.5)	0.10 (0.01)
propoxur	1.3 (0.3)	15 (7)	0.86 (0.03)	13 (4)	1.8 (0.2)	1.22 (0.05)	2.0 (0.5)	2.5 (0.1)	0.74 (0.06)	36 (2)	0.6 (0.1)
carbaryl	0.46 (0.02)	1.2 (0.4)	1.1 (0.1)	7.5 (0.4)	6.8 (0.2)	1.84 (0.06)	1.23 (0.04)	0.29 (0.06)	0.08 (0.01)	1.3 (0.2)	0.20 (0.02)
pirimicarb	0.32 (0.02)	15 (4)	4.3 (1.6)	237 (18)	14 (2)	2.0 (0.3)	1.15 (0.03)	2.8 (0.5)	0.9 (0.1)	1.18 (0.04)	1.4 (0.1)
mean	0.35*	3.5*	1.5	13.3*	10.4*	1.0	1.0	1.2	0.3*	2.0*	0.3*
variance	2	3.8	3	13	3.4	1.6	1.2	2	2	10	2.4

* significant difference

Table 4. Percentage of wild type activity toward acetylthiocholine (ATCh) (SE)

Mutation \ ATCh	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
Y109K	2 (1)	6 (1)	24 (1)
I199W	70 (20)	67 (20)	68 (20)
I199R	117 (25)	86 (25)	68 (25)
I199E	65 (20)	52 (20)	50 (20)
I199V	80 (10)	69 (10)	77 (10)
I199T	80 (30)	85 (30)	83 (30)
I199A	67 (20)	67 (20)	55 (20)
I199G	58 (10)	36 (10)	50 (10)
E275G	1.5 (1)	3 (1)	3 (1)
E275Q	43 (10)	37 (10)	44 (10)
F368W	55 (30)	72 (30)	93 (30)
F368Y	35 (11)	31 (11)	40 (11)
F368H	95 (21)	100 (21)	106 (21)
F368I	51 (10)	58 (10)	68 (10)
F368V	16 (11)	26 (11)	37 (11)
F368C	19 (5)	30 (5)	39 (5)
F368S	20 (15)	24 (15)	34 (15)
F368G	18 (6)	30 (6)	48 (6)
F409G	21 (6)	15 (6)	22 (6)

E. ETUDE DE LA STABILISATION DE LA RESISTANCE PAR MODIFICATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Publication 3: Heterosis and recombination as mechanism reducing the cost of mutations responsible for insecticide resistance.

Menozzi P., Minet C., Boublik Y., Lougarre A., Villatte F., Saint Aguet P., Fournier D. En préparation.

75 souches de drosophile recues du monde entier ont été maintenues au laboratoire depuis plus de deux ans sans pression insecticide. L'analyse de l'activité de l'acétylcholinestérase en présence d'un insecticide, le paraoxon, a fait apparaître que 48 d'entre elles présentaient une enzyme modifiée par rapport à la souche sensible de référence (Canton-S) (Charpentier, 1998). Il semblerait qu'il y ait eu neutralisation du coût lié aux mutations impliquées dans la résistance ou bien sélection de mutations ne présentant pas de coût. Le coût correspond à l'effet négatif qu'un gène de résistance exerce sur la valeur sélective en absence d'insecticide (Roush et Daly, 1990). D'un point de vue biochimique, ce coût correspond pour l'AChE à une modification de l'activité d'hydrolyse de l'acétylcholine.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à identifier les mutations pouvant être impliquées dans la résistance chez 15 souches dont l'activité de l'AChE était modifiée. Le clonage du gène codant pour l'AChE a été effectué à partir de l'ADNc de six individus par souche en utilisant un couple d'amorces hybridant les extrémités 5' et 3' du gène. Les séquences obtenues ont été comparées à la séquence de la souche sauvage (Hall et Spierer, 1986). 21 mutations ont été obtenues (tableau 17).

La présence de ces mutations a été vérifiée par PASA sur l'ADNc des souches pour s'assurer que les mutations obtenues ne provenaient pas d'artéfacts liés à des erreurs de lecture ou à des erreurs de la *Taq* polymérase.

La technique du PASA (PCR Amplification of Specific Alleles) (Sommer *et al.*, 1992) est une technique PCR qui consiste à utiliser une des deux amorces dont l'extrémité 3' est spécifique de la mutation (figure 44). Pour optimiser la spécificité de l'hybridation en 3',

	Biziat	GUA2	MON	NDL	NOR	NOTT	NY	Pierrefeu	RIC	STIC	TBK72	Torreon	WC2	WC97-1	A12
ki R.	4.1	12	2.2	13	3.8	6.2	54	8.7	12	2.6	1.9	91	5.0	?	0.4
a.s.	1.4	1.0	1.4	1.3	1.4	1.5	10	1.2	1.6	0.8	0.8	1	1.8	0.7	0.7
T20A			✓			✓		✓							
I21T							✓								
V57M											✓				
E110G										✓					
E119K							✓								
I199V		✓					✓	✓		✓	✓	✓		✓	
F225L							✓								
E231V											✓				
N266D														✓	
G303A		✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓			✓	✓	
E319G												✓			
N338S		✓													
M343T												✓			
S363P													✓		
F368Y		✓					✓		✓	✓				✓	
G406A								✓							
E491V								✓							
G527D						✓									
K545E						✓									
S571P		✓													
F580L			✓								✓				

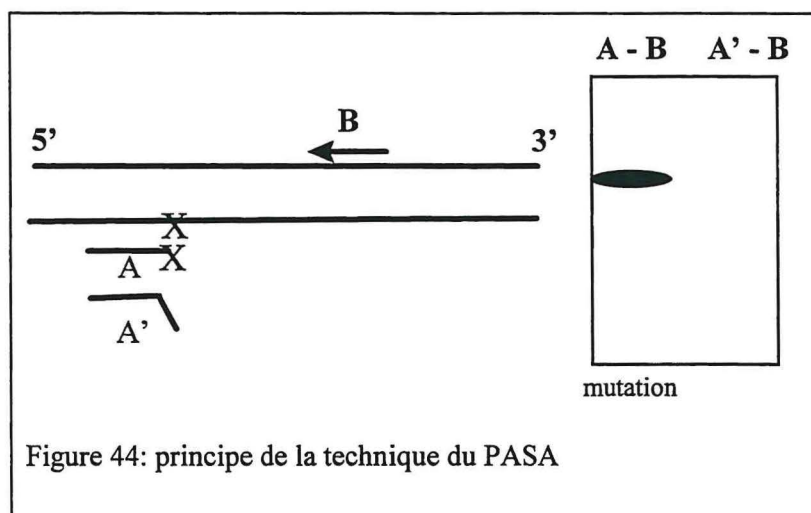
tableau 17: liste des mutations du gène codant pour l'AChE de 15 souches de drosophile

ki R.: ratio de résistance: ki souche de référence Canton-S / ki souche

a.s.: activité spécifique: activité de l'AChE / quantité d'AChE

les conditions PCR ont été travaillées: quantité de matrice, températures d'hybridation en fonction de la température de fusion des amorces, concentration en dNTP, nombre de cycles. Une variante de la technique du PASA a aussi permis d'optimiser cette spécificité: il s'agit de la technique du bi - PASA (bidirectional PASA) (Zhu et Clark, 1996; Liu *et al.*, 1997) qui consiste à rajouter dans le milieu PCR une troisième amorce spécifique du gène et positionnée en 5' de l'amorce spécifique de la mutation (figure 45).

Avec la technique du bi - PASA, d'une part, les mutations connues de résistance ont été retrouvées (I199V, G303A, F368Y, G406A) et d'autre part trois nouvelles mutations ont été mises en évidence: F225L, S571P et F580L. Les protéines recombinantes contenant ces mutations sont en cours de production. Leur activité en présence d'inhibiteurs sera mesurée pour savoir si ces mutations sont impliquées dans la résistance.



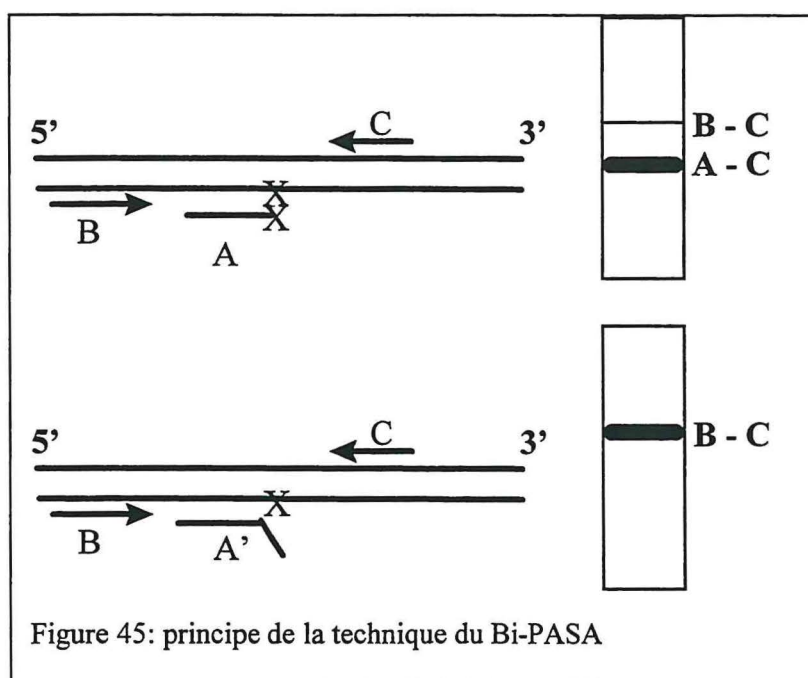


Figure 45: principe de la technique du Bi-PASA

L'analyse par la technique du bi - PASA a montré que quatre mutations connues pour être impliquées dans la résistance sont retrouvées dans les souches résistantes: I199V, G303A, F368Y et G406A. G406A semble être une mutation rare car elle n'a été retrouvée que dans une souche (Pierrefeu).

Pourquoi ces quatre mutations arrivent-elles à se maintenir en absence de pression insecticide ? Des mesures de l'activité de chacune des protéines recombinantes ont été effectuées en présence du substrat de l'enzyme: les protéines recombinantes avec les mutations I199V, F368Y et G406A ont une activité inférieure à celle de la souche de référence alors qu'avec G303A, l'activité est supérieure. L'effet de la mutation G303A pourrait compenser l'effet dépressif des autres mutations. L'activité enzymatique résultante ne serait donc pas modifiée et il en résulterait une absence de coût. Deux hypothèses peuvent expliquer le maintien de la résistance: l'hétérosis ou la recombinaison génétique. L'inventaire des allèles présents dans les différentes souches a été effectué par la technique du Bi-PASA sur ADNc de six individus par souche. Il a été trouvé aussi bien des allèles avec une seule mutation (sauf G406A) qu'avec plusieurs combinaisons de mutations (tableau 18). Il semblerait donc que la recombinaison permette le maintien de la résistance. Il est nécessaire maintenant de tester l'activité des enzymes recombinantes avec toutes les combinaisons de mutations.

La présence d'allèles avec une seule mutation (sauf G406A) plaiderait en faveur d'un avantage procuré par les génotypes hétérozygotes. Il appartient de croiser un individu homozygote pour une des mutations qui diminue l'activité de l'AChE avec un individu homozygote pour G303A. L'analyse des allèles au cours des différentes générations permettra de savoir si l'hétérosis favorise la stabilisation de la résistance en absence de pression insecticide.

Tableau 18: inventaire dans différentes souches de drosophile des allèles trouvés au niveau des positions 199, 303, 368 et 406.

	0	1 mutation			2 mutations				3	4
	IGFG	VGFG	IAFG	IGYG	VAFG	VGYG	VGFA	IAYG	VAYG	VAYA
A12	x									
BIZIAT	x		x							
GUA2									x	
MON	x		x							
NDL	x		x					x	x	
NOR	x		x							
NOTT	x			x						
NY									x	
PIER.							x			
RIC	x	x	x		x	x			x	
STIC									x	x
TBK72		x								
TORR.	x	x						x	x	
WC2	x	x	x		x				x	
WC6	x		x							
WC 97-1								x	x	
WC 97-15						x		x		
WC 97-8	x	x						x		

Publication 3, en préparation:

Heterosis and recombination as mechanism reducing the cost of mutations responsible for insecticide resistance. Menozzi P., Minet C., Boublik Y., Lougarre A., Villatte F., Saint Aguet P., Fournier D..

**Heterosis and recombination as mechanism reducing the cost of mutations
responsible for insecticide resistance**

Philippe Menozzi, Chloé Minet, Yvan Boublik, Andrée Lougarre, Francois Villatte,
Pascale Saint Aguet and Didier Fournier.

Laboratoire de Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique, ESA 5068,
Groupe de Biochimie des Protéines, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France.

All living organisms, procaryotes or eucaryotes, adapt to new environments. In procaryotes mutation rate is sufficient to provide the genetic variability necessary to the selection. But compare to procaryotes, eucaryotes populations are smaller, they reproduced more slowly and consequently mutation rate cannot be an efficient driving force for adaptation. Another mechanism is important in eucaryotes, the sexuality which allows heterosis and rapid recombination of genotypes.

Insecticide resistance is a tool to study the adaptation of eucaryotes to new environments. This resistance can be defined as the adaptation of insects from an environment free of insecticide to a new environment contaminated with new toxic molecules. From the 40's, all the planet is spread with insecticides, and insect developed resistance. At the beginning, resistance appears to be unstable, most of mutation are associated to a genetic cost in absence of selection (Lenormand *et al.*, 1999). But with time resistance stabilizes (Berrada *et al.*, 1995) leading to hypothesis that it exists a coadaptation of the genome to decrease the cost of new mutations.

Insecticide resistance results from three main mechanisms : reduction of insecticide penetration, increased metabolism of the insecticides by esterases, glutathione S-transferases or mixed-function oxidases and modification of the insecticide target. One of the target is well documented, the acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7). It is a key enzyme associated with cholinergic synapses where it rapidly terminates nerve impulse by catalyzing hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. This function can be blocked by insecticides leading to the death of insect. These insecticides are organophosphates (OP) and carbamates (CX). From 1961, when Smitsaert described the first case of reduced sensitivity of AChE as a mechanism of pesticide resistance modified AChEs have been described in many insect species (see Fournier and Mutero, 1994, for review; Moores *et al.*, 1994; Silver *et al.*, 1995; Delorme *et al.*, 1997; Guedes *et al.*, 1997). Some mutations responsible for insecticide resistance have been identified soon after the gene encoding for AChE has been cloned and sequenced (Fournier *et al.*, 1992; Mutero *et al.* 1994; Zhu *et al.*, 1996; Devonshire *et al.*, 1998). Involvement of some mutations in resistance was confirmed by *Drosophila* transformation (Fournier *et al.*, 1992) or by *in vitro* expression (Mutero *et al.*, 1994; French-Constant *et al.*, 1998). Even if involvement of some mutations remains to be tested, it appeared that several mutations decrease insecticide inhibition. But most of mutations give low level of resistance and high resistance is achieved by combination of several mutations in the same protein (Mutero *et al.*, 1994).

Molecular structure of OPs and CXs are analogous to that of substrate acetylcholine. But if deacetylation of the acyl enzyme is rapid when the neurotransmitter is hydrolyzed, dephosphorylation and decarbamylation are slow. As a consequence, insecticide quasi-irreversibly inhibits the enzyme, leading to acetylcholine accumulation in the synapse and consequently insects death.

As OPs and CXs are substrate, mutations decreasing the phosphorylation or carbamylation rate of the active serine simultaneously affect its acetylation rate by

acetylcholine. This alteration of acetylcholine hydrolysis by insecticide resistance has been reported (Voss and Matsumura, 1965; Byrne and Devonshire, 1993; Ayad and Georgiou, 1975; Tang *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1989; Devonshire, 1975; Mamiya *et al.*, 1997). According to this alteration, we hypothesize that each mutation or each combination of mutation has a cost.

To identify strains with mutations involved in insecticide resistance, we collected 75 drosophila strains in the world. They were maintained in laboratory without any insecticide treatment for at least two years. We first looked for the presence of modified AChE using two indices. Modification of the specific activity towards the substrate acetylcholine and modification of phosphorylation rate (ki) for paraoxon. 48 over the 75 strains were found to contain a modified AChE compared to the AChE from the strain Canton-S. This strain is used as reference because it was collected at the beginning of the century and is susceptible to insecticide. As finding high proportion of modified AChE using only two criteria, allows to conclude that most of drosophila strains in the world have a modified AChE.

To know which mutations are responsible for modified AChE, we selected 15 strains with a modified AChE. The 15 genes were sequenced and we found 21 non neutral mutations, changing an amino-acid in the sequence of the mature protein. To ensure that these mutations were not artefactual, i.e. did not originate from polymerase errors during the *in vitro* synthesis of cDNA or DNA amplification, their occurrence in the strain was checked by PASA (Sommer *et al.*, 1992). Only seven mutations remained, namely I199V, F225L, G303A, F368Y, G406A, S571P and F580L. Genes with these mutations were *in vitro* expressed in baculovirus (Chaabihi *et al.*, 1994), and the effect of mutations on resistance of the enzyme to 8 insecticides were tested. Four of them, I199V, G303A, F368Y and G406A provided significant resistance (Table 1). Thus it appears that few

mutations are responsible of resistance in natural populations in contrast to the high number of putative mutations which can provide resistance *in vitro* (Villatte *et al.*, in prep).

Do natural mutations have a cost and do they affect the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine ? To answer to this question, mutated enzymes were produced *in vitro*, purified, and amount of protein was estimated by active site titration (Levy and Ashani, 1986). Hydrolysis of acetylcholine by molecule of enzyme (kobs) was recorded at substrate concentration from 2 μ M to 1 mM. Data are presented in Figure 1. It appears that the four mutations affect AChE hydrolysis, three of them decreased the efficiency of the enzyme while one increased it. Most probably these mutations have a cost since the protein encoded by these alleles hydrolyses the substrate with a different rate from the wild type allele.

Do alleles with only one mutation exist in natural populations ? cDNA were prepared from 6 individuals from 18 strains. Three alleles were found namely, I199V, G303A and F368Y (Table 2) while the forth G406A was never found. This suggests that at least three on the four mutations arose in the wild type allele and not in another mutated allele.

How alleles with one mutation are maintained in absence of insectide selection ? If there is a cost for mutations mutated alleles should be lost. However, one solution exists to maintain the mutation, the heterosis. Figure 2 shows an example of compensation of one allele by the other: heterozygote between G303A and one of the three other mutants gives a mixture of two proteins with the same activity as the wild type protein. To test this hypothesis we analysed the frequency of alleles with only one mutation in some wild type population (BUD). If proportion of heterozygotes is higher than the proportion expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium, we can conclude that heterosis is responsible for the maintenance of mutation. To confirm this hypothesis, we crossed one female with one allele (G303A) and one female with another mutation (I199V).

Another solution exists to maintain mutation in absence of selection, the recombination. Alleles present in 18 strains with modified AChE were recorded by sequencing and PASA (table 2). It appears that most of recombinations exists. *In vitro* production of some recombined proteins (Fig.3) shows that some of them hydrolyse the neurotransmitter with the same efficiency than the wild type enzyme. Besides the compensation of mutation cost, recombination provides another advantage in presence of selection: it increases the resistance to insecticide (Mutero *et al.*, 1994).

Acknowledgment : Strains have been provided by Tom Wilson (Colorado State Univ.), Eric Bonnivard (Univ. Paris 6), Philip Daborn (Melbourne Univ.) and Robert Delorme (INRA, Versailles).

REFERENCES

- Ayad H. and Georghiou G.P. (1975) *J. Econ. Entomol.* **68** : 295-297.
- Berrada S., Nguyen, T.X., Merzoug, D. and Fournier, D. (1995) *J. Appl. Ent.* **119**, 507-510.
- Byrne F.J. and Devonshire A.L. (1993) *Pestic. Biochem. Physiol.* **45** : 34-42.
- Delorme R., Augé D., Bethenod M.T. and Villatte F. (1997) *Pestic. Sci.* **49** : 90.
- Devonshire A.L. (1975) *Biochem. J.* **149**: 463.
- Devonshire A.L., Byrne F.J., Moores G.D. & Williamson M.S. (1998) in *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, Doctor et al. Eds., Plenum Press N.Y., 1998, 491-496
- Ellman G.L., Courtney K. D., Andres V. and Featherstone R. M. (1961) *Biochem. Pharmacol.* **7** : 88-95.
- French-Constant R.H., Pittendrigh B., Vaughan A., Anthony N. (1998) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353, 1685-1693
- Fournier D., Bride J.M., Hoffmann F. and Karch F. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**: 14270-14274.
- Fournier D. and Mutero A. (1994) *Comp. Biochem. Physiol.* **108** : 19-31.
- Guedes R.N.C., Kambhampati S., Dover B.A. and Zhu K.Y. (1997) *Bull. Ent. Res.* **87**: 581-586
- Lenormand T., Bourguet D., Guillemaud T. and Raymond M. (1999) *Nature* **400**, 861-863.
- Levy, D. and Ashani, Y. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1079-1085.
- Mamiya A., Ishikawa Y. and Kono Y. (1997) *Appl. Ent. Zool.* **32** : 37-44.
- Moores G.D., Devine G.J. and Devonshire A.L. (1994) *Pest. Biochem. Physiol.* **49** : 114-120.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M. and Fournier D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 5922-5926.

- Silver A.R.J., van Emden H.F. and Battersby M. (1995) *Pest. Sci.* **43** : 21
- Sommer, S. S., Groszbach, A.R. and Botterna, C.D.K. (1992) *BioTechniques* **12**., 82-87.
- Tang Z.H., Wood R.J., and Cammak S.L. (1990) *Pestic. Biochem. Physiol.* **37**: 192.
- Watanabe M., Takebe S., Kim D.H., Kobashi K., Arakawa R. and Kamimura K. (1989) *Eisui kagaku* **35** : 479-482.
- Williamson M.S., Moores G.D., Walsh S., Dolden T., Mullaley A., Taylor R., Devonshire A.L. (1998). In *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, Doctor et al. Eds., Plenum Press N.Y., 1998, 548
- Zhu K. Y., Lee S. H., Clark J. M. (1996. *Pest. Biochem. Physiol.*, **55**, 100-108

Table 1: Effect of point mutations on resistance of AChE to various insecticides as resistance ratio (ki wild type / ki mutant)

	I199V	F225L	G303A	F368Y	G406A	S571P	F580L
malaoxon	4.53		1.4	4.38	20.1		
paraoxon	1.69		8.27	3.47	6.92		
dimethoate oxon	2.26		1.93	0.93	10.55		
carbaryl	1.34		3.36	3.28	1.41		
carbofuran	0.66		1.91	2.78	2.09		
methiocarbe	0.51		3.15	0.94	2.07		
aldicarbe	0.41		2.51	0.84	2.3		
paraoxon methyl	2.02		3.96	4.27	6.9		
azinphos methyl	3.43		1.45	0.95	8.61		

Table 2: Alleles found in cDNAs at positions 199, 303, 368 and 406

<i>no mutation</i>		<i>two mutations</i>		<i>three mutations</i>	
I G F G	11	V A F G	2	V A Y G	8
<i>single mutation</i>		V G Y G	2	V G Y A	0
V G F G	5	V G F A	1	V A F A	0
I A F G	7	I A Y G	5	I A Y A	0
I G Y G	1	I A F A	0	<i>four mutations</i>	
I G F A	0	I G Y A	0	V A Y A	1

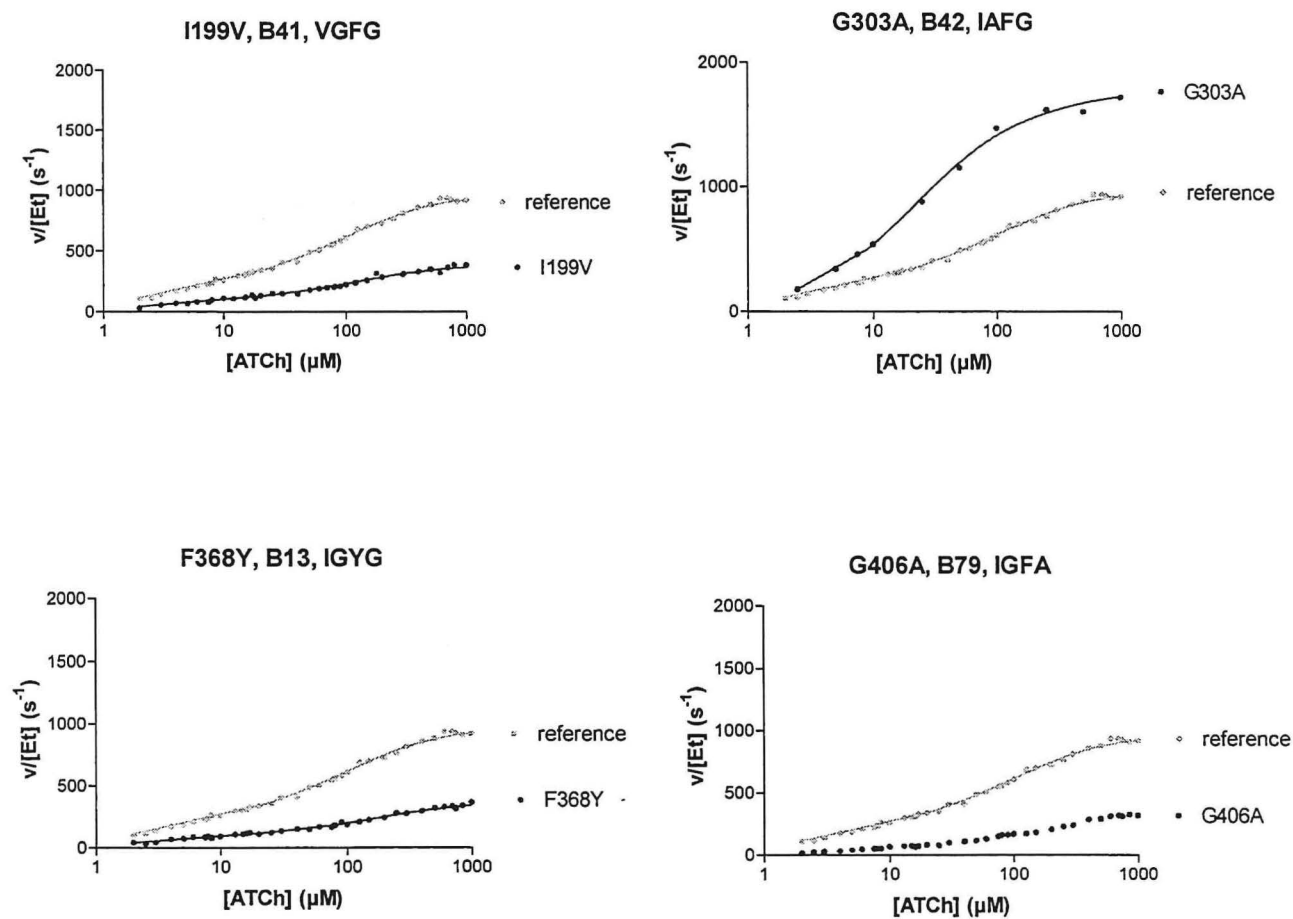


Figure 1

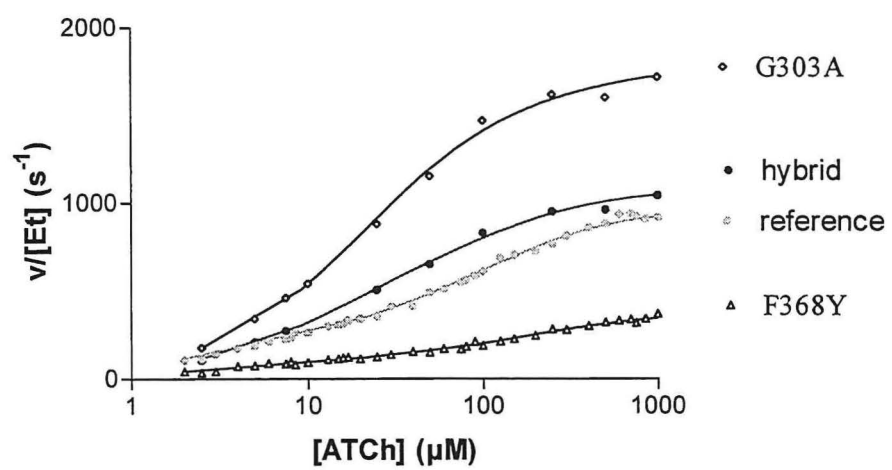


Figure 2

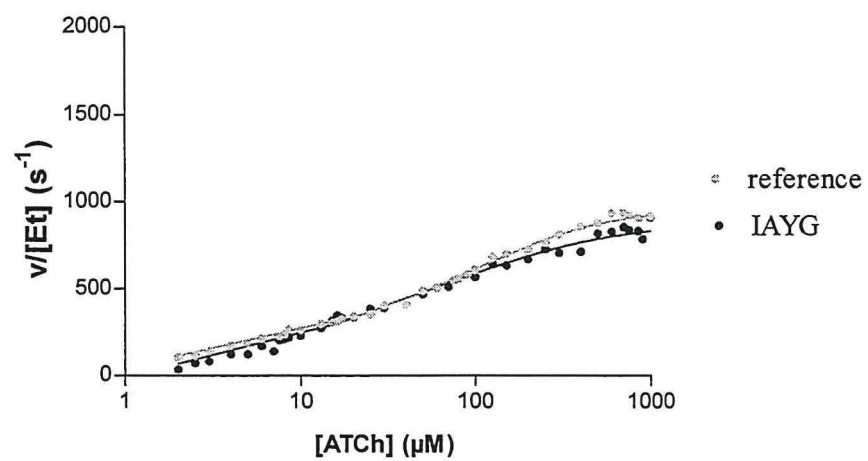
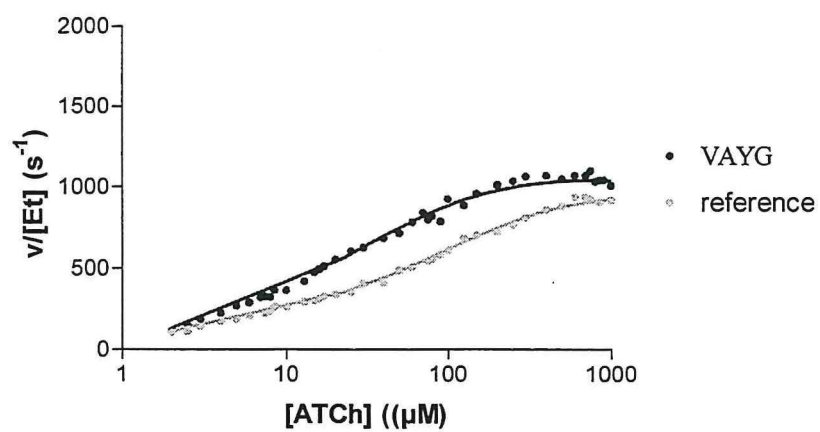


Figure 3

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Les travaux sur le puceron *Aphis gossypii* et le moustique *Culex pipiens* n'ont pas permis de mettre en évidence les mutations impliquées dans la résistance aux insecticides organo-phosphorés et carbamates du gène codant pour l'acétylcholinestérase (AChE) chez ces insectes. Le fort polymorphisme observé dans les séquences des différents clones des souches résistantes est peu compatible avec la notion de gène de résistance sélectionné par une pression insecticide. Le gène cloné chez *A. gossypii* et *C. pipiens* ne serait pas impliqué dans la résistance mais a toutes les caractéristiques d'une acétylcholinestérase.

Ces résultats sont en faveur de l'existence de deux gènes codant pour deux enzymes pouvant être proches. Une de ces enzymes, vitale pour l'insecte, est l'enzyme impliquée, au niveau de la synapse, dans la transmission de l'influx nerveux et la cible des insecticides organo-phosphorés et carbamates. Cette acétylcholinestérase est très stable et très peu exprimée. Les travaux sur l'ADNc ont suggéré que la seconde enzyme, celle dont le gène a été cloné, était surexprimée par rapport à l'AChE synaptique et ne serait pas la cible d'insecticides. Elle ne serait donc pas localisée dans la synapse. Son rôle n'est pas connu mais cette enzyme pourrait se comporter comme une estérase non spécifique.

Les clones de souches résistantes, qu'ils aient été obtenu à partir d'ADN complémentaire ou d'ADN génomique, ont montré un niveau de polymorphisme élevé. Les mutations observées n'ont pas été trouvées au moins deux fois dans deux clones différents. De plus, la position de ces mutations par rapport au site actif de l'enzyme est telle qu'il est difficile de penser qu'elles puissent avoir un rôle dans la résistance. D'autre part, dans aucun clone, il n'a été retrouvé les mutations de résistance qui ont été caractérisées chez d'autres insectes: la drosophile, la mouche domestique et le doryphore.

L'insertion de 11 nucléotides dans l'intron 3 d'une souche de *Culex pipiens* d'Hawaï pouvait être un indice en faveur de la présence du gène recherché. Mais les PCR avec des amorces spécifiques de cette insertion n'ont pas donné d'amplification. Cette insertion pourrait être spécifique de la souche et non d'un gène particulier.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la structure possible du gène impliqué dans la résistance: séquence codante de l'enzyme très voisine des séquences déjà connues et introns de taille identique, séquences codantes proches et taille des introns très différentes. Il

a aussi été émis l'hypothèse que le mécanisme de résistance ne soit pas dû à une acétylcholinestérase modifiée mais à une enzyme ayant les mêmes caractéristiques mais qui n'appartienne pas à la famille des cholinestérases.

Les travaux menés sur l'acétylcholinestérase de drosophile ont permis de mettre en évidence que la surproduction de cette enzyme était un mécanisme de résistance. En effet, une corrélation a été observée entre la quantité d'enzyme dans l'insecte et la résistance au parathion, insecticide organo-phosphoré. Les niveaux de résistance atteints par ce mécanisme restent faibles. Ce mécanisme serait associé à d'autres mécanismes de résistance et aurait pour effet de diminuer le coût lié aux mutations ponctuelles de l'enzyme résistante.

Sur les 28 mutations créées *in vitro* par mutagénèse dirigée sur le gène codant pour l'ACHé de drosophile, 18 sont impliquées dans la résistance *in vitro*. Parmi ces 18 mutations, 15 seraient susceptibles d'être rencontrées dans les populations naturelles car la réduction de l'activité enzymatique liée à ces mutations n'affecterait pas la viabilité de l'insecte. Il doit donc exister dans les conditions naturelles potentiellement plus de mutations que les huit déjà identifiées.

La technique du PASA a permis de mettre en évidence sept mutations dans les populations naturelles de drosophile présentant une acétylcholinestérase modifiée. L'analyse de l'activité des enzymes recombinantes porteuses de chacune des sept mutations a montré que les niveaux de résistance significatifs étaient atteints en présence des mutations I199V, G303A, F368Y et G406A.

Dans des populations de drosophile n'ayant pas été soumises à une pression insecticide pendant plus de deux ans, l'analyse des allèles identifiés grâce à la technique du PASA ainsi que les cinétiques sur les enzymes recombinantes ont suggéré que le maintien de la résistance pouvait s'expliquer par un effet d'hétérosis et par recombinaison de certaines mutations.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En entomologie, de nombreux outils moléculaires sont maintenant disponibles pour caractériser des insectes. Certaines techniques de biologie moléculaire ont été utilisées dans le cadre de ces travaux.

Grâce à la technique RAPD - PCR, qui fait appel à des marqueurs multi-locus, plusieurs biotypes de l'aleurode *Bemisia tabaci* ont été mis en évidence. La caractérisation par cette technique de biotypes inféodés à des plantes-hôtes et à des régions géographiques suggère des biotypes génétiquement différenciés.

Il serait intéressant de poursuivre ces études au niveau mondial et d'essayer d'identifier des marqueurs spécifiques du biotype "B". Une détection précoce grâce à ces marqueurs permettra de prendre les mesures prophylactiques nécessaires pour se protéger efficacement de ce biotype particulièrement agressif. La seule limitation est le manque de reproductibilité propre à la technique RAPD - PCR: le nombre maximum d'échantillons à analyser est conditionné à la capacité du thermocycleur. Il sera préférable d'utiliser d'autres marqueurs moléculaires comme les marqueurs microsatellites une fois qu'ils auront été caractérisés. Ces marqueurs sont en effet bien adaptés à l'étude des relations entre populations d'une même espèce.

L'analyse de la variabilité du gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase mitochondriale selon la technique du CAPS a montré qu'il était peu probable qu'il y ait eu eu croisement entre deux espèces de coccinelles ou bien exclusion de l'un des génomes parentaux. Ces résultats ont utilisé la caractéristique d'une transmission maternelle de l'ADN mitochondrial.

Concernant le collembole *Monobella grassei*, la technique RAPD - PCR a fait apparaître un polymorphisme très élevé au sein des individus de deux sous-espèces (*M. g. banyulensis* et *M. g. distincta*). A l'opposé, la sous-unité II de la cytochrome oxydase mitochondriale n'a présenté aucune variabilité dans les deux sous-espèces. Les individus d'une zone de contact entre ces deux sous-espèces n'ont ainsi pas pu être caractérisés.

D'autres techniques basées sur l'utilisation de marqueurs mono-locus pourront être essayées. Dans un premier temps, la variabilité de marqueurs protéiques pourra être analysée pour chacun des individus de chacune des zones. Si le polymorphisme protéique s'avère trop faible, il sera nécessaire de faire appel à des techniques de biologie moléculaire comme par exemple le séquençage des régions variables du génome de l'insecte: portion d'ADN nucléaire codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique, intron d'un gène codant pour une protéine, variabilité d'une bande amplifiée par RAPD-PCR présente dans tous les échantillons. L'utilisation de marqueurs microsatellites est aussi à envisager, à condition qu'ils aient été au préalable caractérisés.

La résistance aux insecticides organo-phosphorés et carbamates, dans le cas de l'acétylcholinestérase (AChE), est principalement due à des mutations ponctuelles au niveau de l'enzyme. Ces mutations diminuent l'affinité de l'enzyme pour ces insecticides qui sont des analogues du substrat de l'AChE. Ces mutations altèrent l'activité de l'enzyme vis à vis de son substrat (coût biochimique).

A priori, de nombreuses mutations pourraient être impliquées dans la résistance comme cela a été montré sur des AChE recombinantes de drosophile. Mais peu de ces mutations (7) ont été retrouvées dans les populations naturelles. Il doit en effet exister peu de mutations qui modifient la sensibilité aux insecticides et dont l'altération de l'activité de l'AChE n'affecte pas la viabilité de l'insecte.

La surproduction d'acétylcholinestérase, qui a été mise en évidence chez la drosophile comme étant un mécanisme de résistance conférant de faibles niveaux de résistance, pourrait permettre à certaines mutations délétères de se maintenir. Ce mécanisme compenserait le coût associé à ces mutations.

Dans des populations de drosophile n'ayant pas été soumises à une pression insecticide pendant plus de deux ans, l'analyse des allèles présents dans les individus ainsi que les cinétiques sur les enzymes recombinantes ont suggéré que le maintien de la résistance pouvait s'expliquer par un effet d'hétérosis et par recombinaison de certaines mutations. Il est nécessaire de vérifier ces hypothèses d'une part en inventoriant les différents allèles dans chaque individu et d'autre part en suivant l'évolution des allèles à partir d'un croisement entre deux individus homozygotes.

Les stratégies de clonage du gène codant pour l'acétylcholinestérase n'ont pas permis d'identifier le gène impliqué dans la résistance chez le puceron *Aphis gossypii* et *Culex pipiens*. Trois clones ont été obtenus par PCR en utilisant différentes amorces définies sur les régions conservées d'AChE de vertébrés et d'invertébrés à partir d'ADNc et d'ADN génomique. Ils correspondent tous au gène *Ace2* cloné chez le moustique *C. pipiens* (Malcolm *et al.*, 1998) et non impliqué dans la résistance. En tenant compte du clone obtenu par Colin Malcolm, quatre clones indépendants ont donc été obtenus. Les chances de cloner selon ces stratégies le gène impliqué dans la résistance sont faibles: elles ne sont théoriquement que de 1/16 soit 6%. De persévérer selon les stratégies mises en œuvre au cours de ces travaux risque d'avoir peu de chances d'aboutir.

Il serait nécessaire de vérifier dans un premier temps à quelle protéine correspond le gène cloné. Une fois complètement identifié, le gène *Ace2* d'*A. gossypii* et de *C. pipiens* pourra être exprimé *in vitro*. Les caractéristiques de cette enzyme pourront être comparées à celles des deux AChEs identifiées chez *C. pipiens* (Bourguet *et al.*, 1996b). La localisation de cette enzyme dans l'insecte pourra être précisée à l'aide d'anticorps contre la protéine clonée, à condition toutefois que cette enzyme soit suffisamment produite. Si cette enzyme n'est pas localisée dans le système nerveux, cela confirmera qu'elle n'est pas impliquée dans la résistance.

Ces anticorps anti-*Ace2* pourront être testés sur l'AChE des individus résistants. S'ils la reconnaissent, cela indiquera que l'enzyme impliquée dans la résistance est une AChE. S'ils ne la reconnaissent pas, cela suggèrera l'existence d'une enzyme appartenant à une autre famille..

La participation d'un cofacteur dans la résistance pourra être vérifiée après purification de l'AChE des hétérozygotes résistants. L'activité de l'enzyme purifiée en présence d'inhibiteurs sera comparée à celle de l'AChE non purifiée.

Des essais d'hybridation *in situ* pourront être tentés pour localiser, à l'exemple du moustique *Anopheles stephensi*, le ou les locus du gène codant pour l'AChE mais la difficulté résidera dans le choix des sondes à utiliser. Les clones de *C. pipiens* et d'*A. gossypii* risquent de n'indiquer que les localisations correspondant à un gène non impliqué dans la résistance. Il serait intéressant d'essayer une sonde "drosophile" mais l'hybridation pourrait s'avérer

infructueuse si l'homologie avec le gène recherché est trop faible. Il est maintenant techniquement possible de cloner les régions hybridées. Grâce au microscope à effet tunnel, on est capable de localiser précisément ces régions de les découper puis de les cloner.

Enfin une dernière stratégie pourra consister à un microséquençage peptidique de l'enzyme impliquée dans la résistance aux insecticides chez les individus résistants, une fois l'enzyme purifiée. Cela permettra de vérifier si cette enzyme correspond à une AChE ou à une autre famille. Le clonage du gène codant pour cette protéine sera obtenu par PCR à l'aide d'amorces nucléotidiques déduites des peptides séquencés. La comparaison des séquences entre individus sensibles et résistants aboutira alors à l'identification des mutations impliquées dans la résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee H.-J., French-Constant R., 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters*, 368, 461-465

Appleyard M.E., 1994. Non-cholinergic functions of acetylcholinestérase. In multidisciplinary approaches to cholinesterase functions. Edité par Shafferman and Velan, Plenum Press, New York, 285-288

Arpagaus M., Kott M., Vatsis K.P., Bartels C.F., La Du B.N., Lockridge O., 1990. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, 29, 124-131

Arpagaus M., Fedom Y., Cousin X., Chatonnet A., Bergé J.-B., Fournier D., Toutant J.-P., 1994. cDNA sequence, gene structure, and *in vitro* expression of *ace-1*, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 269, 13, 9957-9965

Arpagaus M., Combes D., Culetto E., Grauso M., Fedon Y., Romani R., Toutant J.P., 1998. Four acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Physiology*, 92, 363-367

Banks G.K., Malcolm C.A., Ascolillo A., Hall L.M.C., Robinson A.S., 1996. The evolution of an intron in the acetylcholinesterase genes of Diptera. Proceedings of the XX international congress of entomology, august 1996, Firenze, Italy, 281.

Baxter G.D., Barker S.C., 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterisation and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28, 581-589

Baxter G.D., Barker S.C., 1999. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. *Int. J. Parasitol.*, 29, 1765-1774.

Bedos A., Deharveng L., 1998. A taxonomic and cladistic analysis of the west European genus *Monobella* (Collembola, Neanuridae). *Zoologica Scripta*, 27, 4, 291-309

Bender W., Spierer P., Hogness D. S., 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168, 17-33

Bergé J.-B., Feyereisen R., Amichot M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353, 1701-1705

Berrada S., Fournier D., Cuany A., Nguyen T.X., 1994. Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae): altered acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Pest. Biochem. Physiol.*, 48, 41-47

- Berrada S., Nguyen T.X., Merzoug D., Fournier D., 1995. Selection for monocrotophos resistance in pear psylla, *Cacopsylla pyri* (L.) (Hom., Psyllidae). *J. Appl. Ent.*, 119, 507-510
- Bocquené G., 1996. *L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins*. Thèse de doctorat. Ecole pratique des hautes études, 250 p.
- Bocquené G., Roig A., Fournier D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS letters*, 407, 261-266
- Bonning B.C., Hemingway J., Romi R., Majori G., 1991. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. *Bull Entomol. Res.*, 81, 5-10
- Bourguet D., 1996a. *Mécanismes biochimiques, plasticité et évolution de la dominance. L'acétylcholinestérase et la résistance aux insecticides chez le moustique Culex pipiens*. Thèse. Université Montpellier II, 97 p.
- Bourguet D., Raymond M., Malcolm C.A., Toutant J-P., Arpagaus M., 1996b. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. of Neurochemistry*, 2115-2123
- Bourguet D., Raymond M., Bisset J., Pasteur N., Arpagaus M., 1996c. Duplication of the Ace.1 locus in *Culex pipiens* mosquitoes from the Caribbean's. *Biochem. Genet.*, 104, 351-352
- Bourguet D., Fonseca D., Vourch G., Dubois M.-P., Chandre F., Severini C., Raymond M., 1998a. The acetylcholinesterase gene *Ace*: a diagnostic marker for the *pipiens* and *quinquefasciatus* forms of the *Culex pipiens* complex. *J. of Am. Mosq. Cont. Ass.*, 14, 4, 390-396
- Bourguet D., Fournier D., Toutant J-P., Arpagaus M., Raymond M., 1998b. Acetylcholinesterase and insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*, a review. Dans *Structure and function of cholinesterases and related proteins*, Doctor et al. Editeurs, Plenum Press, NY, 483-489
- Brenner S., 1988. The molecular evolution of genes and proteins : a tale of two serines. *Nature*, 334, 528-530
- Cahill M., Byrne F.J., Gorman K., Denholm I., Devonshire A.L., 1995. Pyrethroid and organophosphate resistance in the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.*, 85, 181-187
- Campbell B.C., Steffen-Campbell J.D., Sorensen J.T., Gill R.J., 1995. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Systematic Entomology*, 20, 175-194

Cauquil J., Follin J.-C. 1983. Les maladies du cotonnier attribuées à des virus ou à des mycoplasmes en Afrique au sud du Sahara et dans le reste du Monde. *Coton et Fibres Tropicales*, 36,4,293-308

Chandre F., Darriet F., Doannio J.M., Rivière F., Pasteur N., Guillet P., 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J. Med. Entomol.*, 34, 6, 664-671

Charpentier A., 1998. *Acétylcholinestérase et résistance aux insecticides. Effets de mutations affectant l'enzyme*. Mémoire de DEA, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, 52 p.

Cousin X., 1996. A cholinesterase gene server (Esther): a database of cholinesterase -related sequences for multiple alignments, phylogenetic relationships, mutations and structural data retrieval. *Nucleic Acids Res.*, 24, 132-136

Deguine J.P., 1995. *Bioécologie et épidémiologie du puceron Aphis gossypii Glover (1877) (Hemiptera, Aphididae) sur cotonnier en Afrique Centrale. Vers une évolution de la protection phytosanitaire*. Thèse ENSAM, Montpellier, 138 p.

Deharveng L., Bedos A., Gisclard C., 1998. Environmental factors, microgeographic patterns of endemism and hybrid zones in *Monobella grassei* (Insecta: Collembola: Neanuridae). *Biol. J. Lin. Soc.*, 64, 527-554

Delorme R., Augé D., Béthenod M.-T., Villatte F., 1997. Insecticide resistance in a strain of *Aphis gossypii* from southern France. *Pestic. Sci.*, 49, 90-96

Delorme R., Fournier D., Chaffaux J., Cuany A., Bride J.M., Auge D., Bergé J.B., 1988. Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* Hub (Lepidoptera, Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.*, 32, 240-246

Devonshire A., Moores G.D., 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pest. Biochem. Physiol.*, 18, 235-246

Devonshire A.L., Byrne F.J., Moores G.D. & Williamson M.S., 1998. Biochemical and molecular characterisation of insecticide-insensitive acetylcholinesterases. In *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, Doctor et al. Eds., Plenum Press N.Y., 1998, 491-496

Dittrich V., Ernst G.H., Ruesch O., Uk S., 1990. Resistance mechanisms in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Sudan, Turkey, Guatemala, and Nicaragua. *J. Econ. Entomol.*, 83, 5, 1665-1670

Doctor B.P., Chapman T.C., Christner C.E., Deal C.D., De La Hoz D.M., Gentry M.K., Ogert R.A., Rush R.S., Smyth K.K., Wolfe A.D., 1990. Complete amino acid sequence of fetal bovine acetylcholinesterase and its comparison in various regions with other cholinesterases. *FEBS letters*, 266, 123-127

- Dong K., 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in german cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 2,93-100
- Drews U., Mengis W., 1990. Contraction wave in the chick blastoderm induced by muscarinic stimulation. *Anat. Embryol.*, 182, 447-454
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95
- Etienne J., 1996. Biochimie génétique. Biologie moléculaire. Masson, 493 p.
- Ferré J., Real M.D., van Rie J., Jansens S., Peferoen M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5119-5123
- Feyereisen R., 1995. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology letters*, 82/83, 83-90
- ffrench-Constant R.H., Rocheleau T.A., Steichen J.C., Chalmers A.E., 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363, 449-499
- ffrench-Constant R.H., Pittendrigh B., Vaughan A., Anthony N., 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes ?. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 1685-1693
- Field L.M., Devonshire A.L., ffrench-Constant R.H., Forde B.G., 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS letters*, 243, 2, 323-327
- Forrester N.W., Cahill M., Bird L.J., Layland J.K., 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in Australia. *Bull. of Entomol. Res.*, supplement 1, 133 p.
- Fournier D., Cuany A., Bride J-M., Bergé J-B., 1987. Molecular poyphormism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.*, 49, 1455-1461
- Fournier D., Bride J-M., Karch F., Bergé J-B., 1988. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* : identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS Lett.*, 238, 333-337
- Fournier D., Karch F., Bride J-M., Hall M. L. C., Bergé J-B., Spierer P., 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.*, 210, 15-22

- Fournier D., Mutero A., Pralavorio M., Bride J.-M., 1992a. *Drosophila* acetylcholinesterase and housefly glutathione transferases : structure and involvement in the resistance to insecticides. In insecticides : mechanism of action and resistance. Edité par Otto D. et Weber B., Intercept (499 p.), 335-344
- Fournier D., Bride J.M., Poirié M., Bergé J.B., Plapp F.W., 1992b. Insect glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 267, 3, 1840-1845
- Fournier D., Bride J.M., Hoffman F., Karch F., 1992c. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.*, 267, 14270-14274
- Fournier D., Mutero A., Rungger D., 1992d. *Drosophila* acetylcholinesterase, expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, 203, 513-519
- Fournier D., Mutero A., 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, 19-31
- Frati F., Simon C., Sullivan J., Swofford D.L., 1997. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J. Mol. Evol.*, 44, 145-158
- Furk C., Powell D.F., Heyd S., 1980. Pirimicarb resistance in the melon and cotton aphid. *Pl. Path.*, 29, 191-196
- Garner K.J., Slavicek J.M., 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing asian and north american gypsy moths. *Insect Mol. Biol.*, 5, 2, 81-91
- Georghiou. G.P., 1992. Overview of insecticide resistance, in *Managing Resistance To Agrochemicals : from fundamental research to practical strategy*, series 421, Plenum Press NY, 18
- Gould S.J., Subramani S., Scheffler I.E., 1989. Use of the DNA polymerase chain reaction for homology probing: isolation of partial cDNA or genomic clones encoding the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase from several species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1934-1938
- Gozlan S., Millot P., Rousset A., Fournier D., 1997. Test of the RAPD-PCR method to evaluate the efficacy of augmentative biological control with *Orius* (Het., Anthocoridae). *Entomophaga*, 42, 4, 593-604
- Graf J. D., Müller W.P., 1979. Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia*, 35, 1574-1576
- Grauso M., Culetto E., Bergé J.B., Toutant J.-P., Arpagaus M., 1996. Sequence comparison of ACE-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A, in the two nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *DNA Seq.*, 6, 4, 217-227

- Grauso M., Culetto E., Combes D., Fedon Y., Toutant J-P., Arpagaus M., 1998. Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS lett.*, 424, 279-284
- Greenspan R.J., Finn J.A., Hall J.C., 1980. Acetylcholinesterase mutants in *Drosophila* and their effects on the structure and function of the central nervous system. *J. comp. Neurol.*, 189, 741-774
- Gubran E., Delorme R., Augé D., Moreau J.P., 1992. Insecticide resistance in cotton aphid *Aphis gossypii* (Glov.) in the Sudan Gezira. *Pest. Sci.*, 35, 101-107
- Guillemaud T., Raymond M., 1997. Comment la résistance vient aux moustiques. *CNRS Info*, 15.02.97
- Guillemaud T., Makate N., Raymond M., Hirst B., Callaghan A., 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Ins. Mol. Biol.*, 6, 4, 319-327
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1, 55-63
- Hall L. M. C., Kankel D.R., 1976. Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 83, 517-533
- Hall L. M. C., Spierer P., 1986. The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.*, 5, 2949-2954
- Hall L. M. C., Malcolm A. C., 1991. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell. Mol. Neur.*, 11, 1, 131-141
- Hemingway J., Small G., Monro A., Sawyer B.V., Kasap H., 1992. Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles saccharosi* populations of the Cukurova plain, Adana province, Turkey. *Med. Veterin. Entomol.*, 6, 342-348
- Hernandez R., He H., Chen A.C., Ivie G.W., George J.E., Wagner G.G., 1999. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 36, 3, 764-770
- Hiss R.H., Norris D.E., Dietrich C.H., Whitcomb R.F., West D.F., Bosio C.F., Kambhampati S., Piesman J., Antolin M.F., Black W.C. 4th., 1994. Molecular taxonomy using SSCP analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes. *Ins. Mol. Biol.*, 3, 3, 171-182
- Hoffmann F., Fournier D., Spierer P., 1992. Minigene rescues acetylcholinesterase lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 223, 17-22
- Howland D.E., Hewitt G.M., 1995. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxydase I sequence data. *Ins. Mol. Biol.*, 4, 3, 203-215

- Jbilo O., L'Hermite Y., Talesa V., Toutant J.P., Chatonnet A., 1994. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. *Eur. J. Biochem.*, 1, 225, 1, 115-124
- Johnson C. D., Russell R. L., 1983. Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. of Neurochemistry*, 30-45
- Johnson C. D., Rand J. B., Herman R. K., Stern B. D., Russell R., 1988. The acetylcholinesterase gene of *C. elegans* : identification of a third gene (ace-3) and mosaic mapping of a synthetic lethal phenotype. *Neuron*, 1, 165-173
- Key K.H.L., 1981. Species, parapatry and the morabine grasshoppers. *Syst. Zool.*, 30, 425-458
- Krejci E., Duval N., Chatonnet A., Vincens P., Massoulié J. 1991. Cholinesterase-like domains in enzymes and structure proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 6647-6651
- Lanzaro G.C., Zheng L., Toure Y.T., Traore S.F., Kafatos F.C., Vernick K.D., 1995. Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 4, 2, 105-112
- Lathe R., 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.*, 183, 1-12
- Leclant F., Deguine J. P., 1994. Aphids (Hemiptera, Aphididae), in *Insect pests of cotton II*. Matthews and Tunstall Eds., 592 p.
- Li Y., Camp S., Rachinsky T.L., Getman D., Taylor P., 1991. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.*, 266, 23083-23090
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S., 1997. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Gen. Res.*, 7, 389-398
- Lockridge O., Bartels C.F., Vaughan T.A., Wong C.K., Norton S.E., Johnson L.L., 1987. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 262, 549-557
- Loxdale H.D., Lushai G., 1998. Molecular markers in entomology. *Bull. Ent. Res.*, 88, 577-600
- Lu Y.J., Kochert G.D., Idenhour D.J., Adang, M.J., 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Mol. Biol.*, 3,2,123-130

- McClellan J.S., Coblenz W.B., Sapp M., Rulewicz G., Gaines D.I., Hawkins A., Ozment C., Bearden A., Merritt S., Cunningham J., Palmer E., Contractor A., Pezzementi L., 1998. CDNA cloning, in vitro expression, and biochemical characterization of cholinesterase 1 and cholinesterase 2 from amphioxus—comparison with cholinesterase 1 and cholinesterase 2 produced in vivo. *Eur J Biochem*, 258, 2, 419-429
- Malcolm C.A., Hall L. M. C., 1990. Cloning and characterisation of a mosquito acetylcholinesterase gene. *Mol. Ins. Sc.*, 57-65
- Malcolm C.A., Rooker S., Edwards A., Heckel D., Hall L.M.C., 1992. PCR generated homologous DNA probes and sequence for acetylcholinesterase genes in insect pests. Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions, 87-90. Edited by A. Shafferman and B. Velan, Plenum Press.
- Malcolm C.A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S.J., Garvey C.F., Hall L.M.C., Pasteur N., Raymond M., 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Ins. Mol. Biol.*, 7,2, 107-120
- Maruyama I. N., Rakow T. L., Maruyama H. I., 1995. CRACE : a simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 3, 18, 3796-3797
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F-M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91
- Massoulié J., Bon S., 1993. L'acétylcholinestérase : une structure originale pour une fonction vitale. *Annales de l'Institut Pasteur, Actualité*, 4, 1, 35-49
- Maulet Y., Camp S., Gibney G., Rachinski T., Ekstrom T.J., Taylor P., 1990. Single gene encodes glycopospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: alternative coding exons contain inverted repeat sequences. *Neuron.*, 4, 289-301
- McTiernan C., Adkins S., Chatonnet A., Vaughan T.A., Bartels C.F., Kott M., Rosenberry T.L., La Du B.N., Lockridge O., 1987. Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 6682-6686
- Moore G. D., Han Z. J., Denholm I., Devonshire A. L., 1996a. Two forms of insecticide-insensitive acetylcholinesterase in *Aphis gossypii*. In *Proceedings Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases*, 1996, 745-750.
- Moore G. D., Gao X., Denholm I., Devonshire A. L., 1996b. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Pest. Biochem. Physiol.*, 56, 102-110.

- Mouches C., Pauplin Y., Agarwal M., Lemieux L., Herzog M., Abadon M., Beyssat-Arnaouty V., Hyrien O., De Saint Vincent B.R., Georghiou G.P., Pasteur N., 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 2574-2578
- Mouches G., Agarwal M., Campbell K., 1992. Molecular biology of insecticide resistance : coamplification of transposon-like elements with an esterase gene responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. In insecticides : mechanism of action and resistance. Edité par Otto D. et Weber B., Intercept (499 p.), 345-353
- Mutero A., Pralavorio M., Simeon V., Fournier D., 1992. Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein. *NeuroReport*, 3, 39-42
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J-M., Fournier D., 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 5922-5926
- Newcomb R.D., East P.D., Russell R.J., Oakesshott J.G., 1996. Isolation of alpha cluster esterases genes associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol.*, 5, 3, 211-216
- Newcomb R.D., Campbell P.M., Ollis D.L., Cheah E., Russell R.J., Oakeshott J.G., 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 7464-7468
- Park Y., Taylor M.F.J., Feyereisen R., 1997. A valine 421 to methionine mutation in IS6 of the *hscp* voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* F.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 3, 688-691
- Piotte C., Arthaud L., Abad P., Rosso M.N., 1999. Molecular cloning of an acetylcholinesterase gene from the plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 99, 2, 247-256
- Pinchard V., 1993. *Etude des mécanismes de résistance à la deltaméthrine chez un ravageur du cotonnier : Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera, Noctuidae). Thèse doctorat INPT Toulouse. 187 p.
- Poirié M., Pasteur N., 1991. La résistance des insectes aux insecticides. *La Recherche*, 234, 22, 875-882
- Rachinsky T.L., Camp S., Li Y., Ekstrom T.J., Newton M., Taylor P., 1990. Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase : tissue distribution of alternatively spiced mRNA species. *Neuron.*, 5, 317-327
- Ragghianti M., Guerrini F., Bucci S., Mancino G., Hotz H., Uzzell T., Guex G.-D., 1995. Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species. *Chrom. Res.*, 3, 497-506

- Raymond M., Fournier D., Bergé J., Cuany A., Bride J-M., Pasteur N., 1985. Single-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1, 4, 425-427
- Raymond M., Fournier D., Bride J-M., Cuany A., Bergé J., Magnin M., Pasteur N., 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *J. Econ. Entomol.*, 79, 1452-1457
- Raymond M., Callaghan A., Fort P., Pasteur N., 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350, 6314, 151-153
- Rodriguez M., Ortiz E., Bisset J.A., Hemingway J., 1993. Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of *Culex quinquefasciatus* field populations of Cuba. *Med. Vet. Entomol.*, 7, 117-121
- Rougerie R., 1997. *Endémisme, parapatrie et spéciation chez les Deutoneura (Collemboles: Neanuridae) des Pyrénées Orientales*. Mémoire D.E.S.U., U.P.S. Toulouse, 98 p.
- Roush R.T., Daly J.C., 1990. The rôle of population genetics in resistance research and management. In *Pesticide resistance in arthropods*, edited by Roush et Tabashnik, Chapman and Hall, New York, 97-152
- Rufingier C., Pasteur N., Lagnel J., Martin C., Navajas M., 1999. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 4, 385-391
- Ryckewaert P., 1998. *Caractérisation des aleurodes du genre Bemisia (Homoptera, Aleyrodidae) dans les petites Antilles et intérêt de leurs auxiliaires en lutte biologique*. Thèse Université Paul Sabatier, Toulouse, 151 p.
- Sanders M., Mathews B., Sutherland D., Soong W., Giles H., Pezzementi L., 1996. Biochemical and molecular characterization of acetylcholinesterase from the hagfish *Myxine glutinosa*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 115, 1, 97-109
- Sarkar G.J., Cassady J., Bottema C.D.K., Sommer S.S., 1990. Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Anal. Biochem.*, 186, 64-68
- Schaefer B.C., 1995. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.*, 227, 255-273
- Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S.S., Friedman T., Taylor P., 1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from cDNA sequence. *Nature*, 319, 407-409

- Scott J.G., Dong K., 1994. Kdr-type resistance in insects with special reference to the german cockroach, *Blattella germanica*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 109, 2-3, 191-198
- Severini C., Romi R., Marinucci M., Raymond M., 1993. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 9, 2, 164-168
- Severson D.W., Mori A., Zhang Y., Christensen B.M., 1993. Linkage map for *Aedes aegypti* using restriction fragment length polymorphisms. *J. Heredity*, 84, 241-247
- Severson D.W., Anthony N.M., Andreev O., ffrench-Constant R.H., 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *The Journal of Heredity*, 88, 6, 520-524
- Shotkoski F., Lee, H.J., Zhang H.G., Jackson M.B., ffrench-Constant R.H., 1994. Functional expression of insecticide-resistant GABA receptors from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect mol. biol.*, 3, 4, 283-287
- Sikorav J.L., Vallette F., Grassi J., Massoulié J., 1985. Isolation of a cDNA clone for a catalytic subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *FEBS lett.*, 193, 2, 159-163
- Sikorav J.L., Krejci E., Massoulié J., 1987. cDNA sequences of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase : primary structure of the precursor of a catalytic subunit ; existence of multiple 5'-untranslated regions. *The EMBO journal*, 6, 7, 1865-1873
- Silver A.R.J., 1995. A biochemical nature of pyrimicarb resistance in two glasshouse clones of *Aphis gossypii*. *Pest. Sci.*, 43, 21-29
- Skibinski D.O.F., Gallagher C., Beynon C.M., 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368, 817-818
- Soderlund D.M., Bloomquist J.R., 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. in *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, London (303 p.), 58-96
- Solano P., Duvallet G., Dumas D., Cuisance D., Cuny G., 1997. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, 65, 175-180
- Sommer S.E., Groszbach A.R., Bottema C.D.K., 1992. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *Biotechniques*, 12, 1, 82-87
- Soreq H., Ben-Haziz R., Prody C.A., Seidman S., Gnatt A., Neville L., Lieman-Hurwitz J., Lev-Lehman E., Ginzberg D., Lapidot-Lifson Y., Zakut H., 1990. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9688-9692

- Sun Y.Q., Feng G.L., Yuang J.G., Gong K.I., 1987. Biochemical mechanism of resistance of cotton aphids to organophosphorus insecticides. *Acta Entomol. Sin.*, 30, 13-20
- Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253, 872-878
- Sutherland D., McClellan J.S., Milner D., Soong W., Axon N., Sanders M., Hester A., Kao Y-H., Poczatek T., Routt S., Pezzementi L., 1997. Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus. *J. Exp. Zool.*, 277, 3, 213-229
- Symondson W.O.C., Hemingway J., 1997. Biochemical and molecular methods for detection of insecticide resistance., 319-350 in *Methods in ecological and agricultural entomology*. CAB INTERNATIONAL, édité par Dent D.R. et Walton M.P.,
- Tagu D., 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. INRA Editions, 131 p.
- Talesa V., Principato G. B., Giovannini E., Grauso M., Rosi G., 1993. Evidence for a molecular polymorphism of cholinesterase in *Sepia officinalis* (Cephalopoda : Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106, B, 557-562
- Talesa V., Grauso M., Arpagaus M., Giovannini E., Rosi G., 1999. Molecular cloning and expression of a full-length cDNA encoding acetylcholinesterase in optic lobes of the squid *Loligo opalescens*: a new member of the cholinesterase family resistant to diisopropyl fluorophosphate. 72, 3, 1250-1258
- Thompson M., Steichen J.C., French-Constant R.H., 1993. Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Mol. Biol.*, 2, 149-154
- Tomita T., Liu N., Smith F.F., Sridhar P., Scott J.G., 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.*, 4, 3, 135-140
- Toutant J-P., Arpagaus M., Fournier D., 1988. Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.*, 50, 209-218
- Vaissayre M., Menozzi P., Nibouche S., Deguine J-P., 1998. Les aleurodes dans les systèmes de culture cotonniers: biologie et gestion des populations. *Agriculture et Développement*, 20, 4-12
- Vanlerberghe-Masutti F., 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera, Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Mol. Biol.*, 3, 4, 229-237
- Vanlerberghe-Masutti F., Chavigny P., Fuller S.J., 1998. Characterization of microsatellite loci in the aphid species *Aphis gossypii* Glover. *Mol. Ecol.*, 8, 693-695

Villatte F., 1995. *Implication des estérases et de l'acétylcholinestérases dans la résistance aux organophosphorés et aux carbamates chez une souche française d'Aphis gossypii (Glover)*. Mémoire de stage de D.E.A., Université Paris 6, 27 p.

Villatte F., 1998. *Acétylcholinestérase d'insectes : résistance et sensibilité aux insecticides*. Thèse doctorat, Université Paris 6.

Villatte F., Augé D., Touton P., Delorme R., Fournier D., 1999. Negative cross-insensitivity in insecticide-resistance cotton aphid *Aphis gossypii* Glover. *Pest. Biochem. Physiol.*, 65, 55-61

Vinson S.B., Law P.K., 1971. Cuticular composition and D.D.T. resistance in the tobacco budworm. *J. Econ. Entomol.*, 64, 1387-1390

Walsch S.P., Metzger D.A., Higushi R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based typing from forensic material. *Biotechnic*, 10, 506-513

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M., 1994. ADN recombinant. DeBoeck Université, 626 p.

Wilkerson R.C., Gaffigan T.V., Lima J.B., 1995. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by RAPD (Diptera, Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90, 6721-732

Williamson L.S., Moores G.D., Devonshire A.L., 1992. Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistance houseflies (*Musca domestica*). Dans *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*, Shafferman A. and Velan B. Eds., 1992, 83-86

Williamson M.S., Moores G.D., Walsh S., Dolden T., Mullaley A., Taylor R., Devonshire A.L., 1998. Mutations in the housefly acetylcholinesterase gene that confer resistance to insecticides. In *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, Doctor et al. Eds., Plenum Press N.Y., 1998, 548

Wirth M.C., Georgiou G.P., 1996. Organophosphate resistance in *Culex pipiens* from Cyprus. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 12, 1, 112-118

Zhang D.-X., Hewitt G.M., 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol. Biol.*, 6, 2, 143-150

Zhu K.Y., Clark J. M., 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25, 10, 1129-1138

Zhu K. Y., Clark J. M., 1996. Addition of a competitive primer can dramatically improve the specificity of PCR amplification of specific alleles. *Biotechniques*, 221, 586-590

Zhu K. Y., Lee S. H., Clark J. M., 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in colorado potato beetle. *Pest. Biochem. Physiol.*, 55, 100-108

Zouros E., Freeman K.R., Ball A.O., Pogson G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, 359, 412-414

ANNEXES

ANNEXE 1: LISTE DES AMORCES

NOM		SEQUENCE PEPTIDIQUE	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE 5' → 3'	POSITION AChE DROSO
-----	--	------------------------	-----------------------------------	---------------------------

Groupe Cholinestérases du Laboratoire de Physiologie Animale de l'INRA de Montpellier

W-droso	sens	GEEIWN	ggi ga(a,g) ga(a,g) at(a,c,t) tgg aa	117-122
W-ace1	sens	GSTMWN	ggi (t,a)(c,g)i aci atg tgg aa	117-122
W-ACHE	sens	GTEMWN	ggi aci ga(a,g) atg tgg aa	117-122
EDCLY	sens	EDCLYLN	ga(a,g) ga(c,t) tg(c,t) cti ta(c,t) cti aa	129-135
F1 sens	sens	FGESAG	tt(t,c) ggi ga(a,g) tci gci gg	273-278
F2 sens	sens	FGESAG	tt(t,c) ggi ga(a,g) ag(t,c) gci gg	273-278
S15	sens	WMGVXHGYE	tgg atg ggi gti iii ca(t,c) ggi (t,g)a(t,c) ga	513-521
R15	rev	WMGVXHGYE	acc tac cci cai iii gt(a,g) cci (a,c)t(a,g) ct(t,c)	513-521

Laboratoire Génétique et Environnement de l'Université de Montpellier II

f 1457	sens	EEMWNP	gag gag atg tgg aat ccc aa	118-123
Flnew	sens	GEEMWNP	ggc ga(a,g) ga(a,g) atg tgg aa(c,t) cc	117-123
r 1457	rev	MLVWIYG	tac gac cag acc tag atg ccc	181-187
G1new	rev	WIYGGGFM	cc tag at(a,g) cci cca cci aa(a,g) tac t	184-191
TLFGEREV	rev	TLFGESA	gi gai aag cci ctc agc cg	271-277

Laboratoire d'Entomologie Appliquée, Université Paul Sabatier de Toulouse

amorces non dégénérées:

B1	sens	GIPIYAKPPV	ggc atc cca tat gcc aag ccc cct gt	69-77
B2	sens	WNPNTNVSEDCLY	tgg aac cca aac acc aat gtc tct gag gac tgc ctg ta	121-133
B3	sens	YRVGAFGFL	tac cgg gtg ggc gcc ttt ggc ttc c	218-226
B4	rev	YRVGAFGFL	g gaa gcc aaa ggc gcc cac ccg gta	218-226
B5	rev	WGEWMGV LH	cc atg cag cac gcc cat cca ctc gcc cca	510-518
B6	rev	FAKTGNPAQ	tg ggc agg gtt gcc tgt ctt ggc aaa	554-562
B7	rev	FWNDYLPK	tt ggg cag gta gtc att cca gaa	600-607

amorces dégénérées:

C1	sens	(E,S)G(T,S)EIWN	(g,t)(a,c)(g,t) ggc (a,t)c(a,t) gag atg tgg aac cc	116-122
C2	sens	G(A,S)(A,S)(T,S)LD	ggc (g,t)cc (g,t)cc (a,t)cc ctg gat gt	193-198
C3	sens	(A,V)(G,A)E(G,A)RRR	g(c,t)(c,g)g(g,c)(c,t) gag g(g,c)c cgg cgg cgg gc	315-321
D1S	sens	WIYGGG	tgg at(c,a) ta(c,t) gg(c,t,g) gg(t,a) gg(c,g,t)	184-189
D2S	sens	WDQ(I,A)LA	tggga(c,t)ca(a,g)(g,a)(c,t)(g,a,t)(c,t)t(a,g,c)gc(c,t,a)	247-252
D3S	sens	MR(S,A,N,Q)VDA	atg(c,a)g(a,t)(a,g,t)(a,c)(a,c,t)gt(g,t)ga(c,t)gc(a,c,t)	345-350
C4	rev	(A,V)(G,A)E(G,A)RRR	gc cgg ccg ccg ccg g(c,g)c ctc(a,g)(c,g)c(c,g)(a,g)c	315-321
C5	rev	G(A,V)PGFSK	tc ctt gga gaa gcc agg (c,g)(a,g)c gcc	413-419
C6	rev	(L,P)HGYEIE	aa ctc aat ctc gta gcc atg g(a,g)(g;t)	517-523

D1R	rev	AS(F,M)QYR	(a,c,t)c(g,t)(g,a)ta ctg(g,c)a(t,a)(t,g,c)ga(c,g,a)gc	214-219
D2R	rev	NAPWS(Y,H)M	cat(a,g)t(a,g)(a,g)ctcca(a,g,c)gg(a,g,c,t)gcgtt	306-312
D3R	rev	G(S,N)(N,V)(H,R,L,K) (D,N)E	ac(t,c)tc(g,a)a(t,c)(c,g,a)(t,a,c)(t,g)(a,g)(t,a)(t,c) (a,g)(c,t)t(t,c,a)cc	400-405

amorces spécifiques du gène codant pour AChE de drosophile

OL44	sens	AKPPVE	c gcc aag ctg ccc gtc g	73-77
E107Yv	sens	SATYCVQY	tcc gcc acc gtc gtc caa tat	101-107
OL21F	sens	RYEYF	g cgt tac gag tac ttc	108-112
OL23	sens	NPQSTTN	aat ccg cag tgc acg acc aac	171-177
OL67	sens	LDGYNA	cc ctg gac ggc tac aat gcg	197-202
OL68	sens	LDEYNA	cc ctg gac gag tac aat gcg	197-202
OL69	sens	LDKYNA	cc ctg gac aag tac aat gcg	197-202
OL85	sens	TLFGQSAGGS	aca ctg ttc gga cag tgc gct ggg tcc ag	271-279
S310Gv	sens	TMNAPWG	act atg aac gcc ccc tgg ggg	304-310
C328Wv	sens	GKALINDW	ggc aag gcg ctg atc aac gac tgg	321-328
Y109G	rev	QERGEYF	gaa gta ctc gcc acg ctc ttg	106-112
Y111G	rev	RYEGFPG	gcc ggg gaa gcc ctc gta acg	108-114
F115S	rev	FPGSSGEE	ctc ctc gcc gga gct ccc ggg gaa	112-118
W121A	rev	EEIAWNP	gtt ggg gtt cgc gat ctc ctc	118-124
SEQ1	rev	EDCLYI	tat gta gag gca gct ctc	129-134
SEQ2	rev	GRGANGG	acc ccc gtt ggc acg ccg ccc	147-153
M191Y	rev	GGGFYTG	cga tcc ggt gta gaa gcc acc gcc	187-194
I199V	rev	LDVYNAD	cgc att gta gac gtc cag gg	197-203
V220L	rev	QYRLGAF	aaa ggc tcc tag gcg ata ctg	217-223
V244T	rev	GN7GLWD	atc cca tag gcc cgt att gcc	242-248
S276A	rev	FGEAAGSS	act gga acc agc cgc ctc tcc gaa	273-280
G303A	rev	MQSATMN	gtt cat agt tgc cga ctg cat	300-306
T313G	rev	HMGSEKA	ggc ctt ctc gga gcc cat gtg	311-317
Y362Av	rev	ASGILSF	aaa gct gag gat gcc cga ggc	310-316
L366F	rev	SGIFSFP	cga ggg aaa gct gaa gat gcc cga	363-370
F368I	rev	ILS/PSAP	ggg cgc cga ggg tat gct gag gat	365-372
F368V	rev	ILS/PSAP	ggg cgc cga ggg tac gct gag gat	365-372
Y408I	rev	EGT/FLL	cag caa gaa gat agt gcc ctc	405-411
F409I	rev	GTY/LLY	gta cag caa gat gta agt gcc	406-412
Y412C	rev	LLCDFI	c gat caa atc aca cag caa g	410-415
Y412I	rev	FLL/DFI	gat caa atc gat cag caa gaa	409-415
D413G	rev	LLYGLID	atc gat caa tcc gta cag caa	410-416
K420G	rev	FDGDDA	gt ggc atc gtc ccc atc gaa g	418-423
SEQ3	rev	LEIMNN	att gtt cat aat ttc cag	432-437
W510G	rev	SLWGEW	at cca ttc gcc ccc caa tga g	508-513
H518K	rev	GVLKGDEIE	ttc gat ctc atc gcc ctt aag cac gcc	515-523
N569S	rev	EWPSFSK	ctt gga gaa gct tgg cca ctc	566-572

amorces spécifiques *Ace2 Aphis gossypii*

WTG	sens	WTGVLN	tgg acg ggt gtg ctg aac	91-96
WNP	sens	WNPNTK	tgg aac ccg aac acc aag	121-126
EDSD	sens	EDSDDA	gag gat agc gat gac gcg	234-239
ENAAAF	sens	ENAAAF	gaa aac gca gca gct tt	258-263
QYS	sens	QYSGWE	cag tat tcg gga tgg gaa	462-467
FTH	sens	FTHRTD	ttc act cac agg acc gac	501-506
WNP2	rev	WNPNTK	ctt ggt gtt cgg gtt cca	121-126
LSE	rev	LSEDCL	taa gca gtc ctc gga gag	127-132
MSG	rev	MSGTST	tgt cga agt acc gga cat	191-196
GDL	rev	GDLLAA	agc cgc caa taa atc gcc	202-207
MVK	rev	MVKRGI	gat acc acg ttt tac cat	294-299
EKF	rev	EKFVQI	tat ttg tac aaa ttt ttc	438-443

amorces spécifiques *Ace2 Culex pipiens*

YEY	sens	YEYFPG	tat gaa tat ttc ccg gg	109-114
NTN	sens	NTNVSE	aac acg aac gtc tcg gag	124-129
NTN2	sens	NTNVSE	aac aca aac gta tcg ga	124-129
LDV	sens	LDVYNA	ctg gac gtt tac aac gca	197-202
KEN	sens	KENAKA	aag gag aac gcc aag gcc	257-262
TAE	sens	TAEKAL	acg gcg gag aag gcc ctg	313-318
SPGS	sens	SPGSVM	tca ccc ggc tca gtg atg	338-443
SKA	sens	SKASEP	agc aag gcg tcg gaa cct	449-454
VHY	sens	VHYYYF	gtt cat tat tac tac ttt	496-501
SED	rev	SEDCLY	ata cag aca gtc ctc cga	128-133
YLN	rev	YLNWV	gtt caa gta ggg cga aag	133-138
DFQ	rev	DFQRQH	gtg ctg ccg ctg gaa gtc	164-169
QSK	rev	QSKGGL	gag gcc gcc ctt gga ctg	170-175
FMS	rev	FMSGTS	tga tgt tcc gct cat aaa	190-195
LHL	rev	LHLLSP	cgg gga caa cag gtg caa	284-289
SHM	rev	SHMTAE	ctc cgc cgt cat gtg gct	310-315
SAP	rev	SAPTID	gtc gat tgt tgg cgc cga	370-375
PER	rev	PEREAI	aat cgc ttc acg ctc agg	454-459
LGL	rev	EFALGL	aag tcc cag cgc aaa ctc	484-489

amorces "anti pasa"

B9	sens	WNPNTNV	tgg aat ccc aac acg aac gt(g,t)	121-127
B8	rev	GRAVGDH	atg atc gcc gac tgc tcg (a,g,t)	472-478

amorces particulières

NOM		SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE 5' → 3'	indication
5'PCR	sens	tac ggc tgc gag aag acg aca gaa	SMART
KS3	sens	aca aaa gct gga gct cca ccg c	aval T3
DTSPEC	rev	aac tgg aag aat tcg cgg ccg cag g	OligodT
I3Haw	sens	tctgtccttgccgagctgcc	intron 3'
I3Hawrev	rev	tggcagctcggcaaggacaga	intron 3'

ANNEXE 2: ALIGNEMENTS SEQUENCES *Ace2 APHIS GOSSYPPII* (EXONS) avec position des amorces

LEGENDE: R pour clone résistant; SN pour clones sensibles

>: amorce sens; <: amorce reverse

(les nombres en exposant font référence à la position chez la drosophile)

```

AgR48      D   P   W   T   G   V   L   N   A   T   R   L   P   N   T   C   Y
           GAT CCC TGG ACG GGT GTG CTG AAC GCC ACC AGA TTG CCG AAT ACG TGC TAC
AgR18
           A   T   R   L   P   N   T   C   Y
           GCC ACC AGA TTG CCG AAT ACG TGC TAC
AgR14
           A   T   R   L   P   N   T   C   Y
           GCC ACC AGA TTG CCG AAT ACG TGC TAC
AgSN10
           A   T   R   L   P   N   T   C   Y
           GCC ACC AGA TTG CCG AAT ACG TGC TAC
AgSN6
           A   T   R   L   P   N   T   C   Y
           GCC ACC AGA TTG CCG AAT ACG TGC TAC

```

E107Y < CAG CAG

```

AgR48      Q   E107 R   Y109 E   Y111 F   P   G   F115 V   G   E   E   M   W121 D
           CAA GAG CGG TAC GAG TAC TTT CCC GGG TTC GTT GGC GAA GAG ATG TGG GAC
AgR2  5' PCR G   S   G   G   Y   G   C   E   K   T   T   K   G   M   W   N
           G GGA TCT GGG GGT TAC GGC TGC GAG AAG ACG ACG AAG GGG ATG TGG AAC
AgR18
           Q   E   R   Y   E   Y   F   P   G   F   V   G   E   E   M   W   N
           CAA GAG CGG TAC GAG TAC TTT CCC GGG TTC GTT GGC GAA GAG ATG TGG AAC
AgR14
           Q   E   R   Y   E   Y   F   P   G   F   V   G   E   E   M   W   N
           CAA GAG CGG TAC GAG TAC TTT CCC GGG TTC GTT GGC GAA GAG ATG TGG AAC
AgSN10
           Q   E   R   Y   E   Y   F   P   G   F   V   G   E   E   M   W   N
           CAA GAG CGG TAC GAG TAC TTT CCC GGG TTC GTT GGC GAA GAG ATG TGG AAC
AgSN6
           Q   E   R   Y   E   Y   F   P   G   F   V   G   E   E   M   W   N
           CAA GAG CGG TAC GAG TAC TTT CCC GGG TTC GTT GGC GAA GAG ATG TGG AAC

```

GTT ATA GCA ATG CTC < E107Y

OL21F > G CGT TAC GAG TAC TTC

F1 NEW > GGC GA(A,G)GA(A,G)ATG TGG AA(C,T) CC

B9 > TGG AAT

GTT CTC GCA CCG CTC ATG AAG < Y109G

GCA ATG CTC CCG AAG GGG CCG < Y111G

AAG GGG CCC TCG AGG CCG CTC CTC < F115S

CTC CTC TAG CGC<W121A

B2 > TGG AAC

YEY > TAT GAA TAT TTC CCG GG

AgR1	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR48	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR2	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR10															R	E	G	
																AGA	GAA	GGG
AgR35	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR58	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR7	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR18	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgR14	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgSN10	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	
AgSN6	P	N	T	K	L	S	E	D	C	L	Y	L	N	I	W	I	P	
	CCG	AAC	ACC	AAG	CTC	TCC	GAG	GAC	TGC	TTA	TAC	TTG	AAT	ATT	TGG	ATA	CCG	

CCC AAC ACG AAC GT (G,T) > B9
 CTC CTG ACG GAG ATG TAT < SEQ1
 CCA AAC ACC AAT GTC TCT GAG GAC TGC CTG TA > B2
 NTN > AAC ACG AAC GTC TCG GAG
 AGC CTC CTG ACA GAC ATA < SED
 GAA AGC GGG ATG AAC TTG < YLN

AgR1	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR48	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR2	K	K															
	AAG	AAA															
AgR10	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR35	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR58	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR7	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR18	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgR14	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgSN10	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA
AgSN6	K	K	Q	R	T	R	H	H	S	N	N	A	H	H	A	K	I
	AAG	AAA	CAG	CGC	ACC	AGG	CAC	CAT	TCG	AAT	AAC	GCA	CAT	CAT	GCC	AAG	ATA

CCC GCC GCA CGG TTG CCC CCA < SEQ2

AgR1 P V L V W I Y G G G Y M¹⁹¹ S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR48 P V L V W I Y G G G Y M S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR10 P V L V W I Y G G G Y M S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR35 P V L V W I Y G G G Y M S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR58 P V L V W I Y G G G Y M S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR7 P V L V W I Y G G G Y M S G T S T
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT GGA GGT TAT ATG TCC GGT ACT TCG ACA
 AgR18 P V L V W I Y G
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT
 AgR14 P V L V W I Y G
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT
 AgSN10 P V L V W I Y G
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT
 AgSN6 P V L V W I Y G
 CCA GTA CTA GTT TGG ATA TAT GGT

CC TAG AT(A,G) CCI CCA CCI AA(A,G) TAC T < G1 NEW
 CCG CCA CCG AAG ATG TGG CCT AGC < M191Y
 MSGT < TAC AGG CCA TGA AGC TGT
 FMS < AAA TAC TCG CCT TGT AGT

AgR1 L D I¹⁹⁹ Y D G D L L A A T F D V M I
 TTA GAT ATC TAT GAC GGC GAT TTA TTG GCG GCT ACG TTC GAT GTA ATG ATT
 AgR35 L D I
 TTA GAT ATC
 AgR58 L D I
 TTA GAT ATC
 AgR7 L D I
 TTA GAT ATC
 CC CTG GAC ACC TAC AAT G > OL 66
 CC CTG GAC GGC TAC AAT GCG > OL 67
 CC CTG GAC GAG TAC AAT GCG GAT ATC > OL 68
 CC CTG GAC AAG TAC AAT GCG > OL 69
 CC CTG GAC GTC TAC AAT > OL 41A
 GG GAC CTG CAG ATG TTA CGC < I199V
 CTG GAC GTT TAC AAC GCA > LDV

AgR1 A S M Q Y R L²²⁰ G A F G S L Y L T P
 GCC TCA ATG CAG TAT AGG CTT GGG GCA TTT GGT TCA TTG TAT TTA ACG CCC
 GTC ATA GCG GAT CCT CGG AAA < V220L
 B3 > TAC CGG GTG GGC GCC TTT GGC TTC C
 ATG GCC CAC CCG CGG AAA CCG AAG G < B4

AgR1 E L P E D S D D A P G N M²⁴⁴ G L W D
 GAG CTC CCT GAG GAT AGC GAT GAC GCG CCT GGA AAT ATG GGA TTA TGG GAT
 AgSN4 P G N M G L W D
 CCT GGA AAT ATG GGA TTA TGG GAT
 AgSN5 P G N M G L W D
 CCT GGC AAT ATG GGA TTA TGG GAT
 AgSN7 P G N M G L W D
 CCT GGC AAT ATG GGA TTA TGG GAT
 AgSN9 P G N M G L W D
 CCT GGC AAT ATG GGA TTA TGG GAT

EDSD > GAG GAT AGC GAT GAC GCG
 V244T < CCG TTA TGC CCG GAT ACC CTA

AgR1	Q	A	L	A	I ²⁵³	K	W	I	K	E	N	A	A ²⁶¹	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR8					I	K	W	I	K	E	N	A	P	A	F	G	A
					ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	CCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN4	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN5	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN7	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN9	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCA	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR35	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR58	Q	A	L	A	N	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	AAC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR7	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN16	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgSN18	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR3	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT
AgR71	Q	A	L	A	I	K	W	I	K	E	N	A	A	A	F	G	A
	CAA	GCG	CTG	GCT	ATC	AAG	TGG	ATC	AAA	GAA	AAC	GCA	GCA	GCT	TTC	GGA	GCT

KEN > AAG GAG AAC GCC AAG GCC

AgR1	E ²⁶⁶	P	E	T ²⁶⁹	I	T	L	F	D ²⁷⁴	E	S ²⁷⁶	A	G	G	G	S	V
	GAA	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GAT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR8	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgSN4	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgSN5	D	P	E	T	I	T	L	F	G								
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT								
AgSN7	D	P	E	T	I	T	L	F	G								
	GAT	CCT	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT								
AgSN9	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR35	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR58	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR71	D	P	E	A	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	GCA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgSN16	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgSN18	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR3	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA
AgR71	D	P	E	T	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	G	S	V
	GAT	CCA	GAG	ACA	ATT	ACA	TTA	TTT	GGT	GAA	TCA	GCA	GGC	GGT	GGA	TCA	GTA

F1 SENS > TT(T,C) GGI GA(A,G) TCI GCI GG
 F2 SENS > TT(T,C) GGI GA(A,G) AG(T,C) GCI GG
 OL 85 > ACA CTG TTC GGA CAG TCG GCT GGG TCC AG
 AA(G,A) CCI CT(T,C) AGI CGI CC < F1 REV
 AA(G,A) CCI CT(T,C) TC(G,A) CGI CC < F2 REV
 GI GAI AAG CCI CTC AGC CG < TLF REV
 AAG CCT CTC CGC CGA CCA AGG TCA < S276A

```

AgR1      S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgR8      S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgSN4     S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgSN9     S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgR35     S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgR58     S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC
AgR71     S  V  H  L  I  S  P  E  T  R  G  M  V  K  R  G  I
          AGC GTG CAC TTA ATT TCG CCG GAA ACA AGA GGC ATG GTA AAA CGT GGT ATC

```

AAC GTG GAC AAC AGG GGC < LHL

```

AgR1      I  Q  S  G303 T  V  N  A  P  W  S310 Y  M  T313 G  E  R
          ATA CAG TCT GGC ACC GTG AAC GCA CCT TGG AGC TAC ATG ACT GGT GAA CGA
AgR8      I  Q  S  G  T  V  N  A  P  W  S  Y  M  T  G  E  R
          ATA CAG TCT GGC ACC GTG AAC GCA CCT TGG AGC TAC ATG ACT GGT GAA CGA
AgSN4     I  Q  S  G  T  V  N  A  P  W  S  Y
          ATA CAG TCT GGC ACC GTG AAC GCA CCT TGG AGC TAC
AgSN9     I  Q  S  G  T  V  N  A  P  W  S  Y
          ATA CAG TCT GGC ACC GTG AAC GCA CCT TGG AGC TAC

```

S310G VER > ACT ATG AAC GCC CCC TGG GGG
TAC GTC AGC CGT TGA TAC TTG < G303A

T313G < GTG TAC CCG AGG CTC TTC
SHM < TCG GTG TAC TGC CGC CTC
TAE > ACG GCG GAG AAG

```

AgR1      A  V  E  I  A  K  K  L  L  D  D  C328 N  C  N  S  T
          GCA GTA GAA ATA GCA AAG AAA TTG TTG GAC GAT TGC AAT TGC AAT TCA ACG
AgR8      A  V  E  I  A  K  K  L  L  D  D  C  N  C  N  S  T
          GCA GTA GAA ATA GCA AAG AAA TTG TTG GAC GAT TGC AAT TGC AAT TCA ACG
AgSN3     D  C  N  C  N  S  T
          GAT TGC AAT TGC AAT TCA ACG
AgSN9     N  C  N  S  T
          AAT TGC AAT TCA ACG

```

C328W VER > GGC AAG GCG CTG ATC AAC GAC TGG
GCC CTG > TAE

```

AgR1      S  L  D  S  N  P  I  G  T  M  S  C  M  R  S  V  D
          TCA TTG GAT AGT AAC CCG ATC GGT ACC ATG TCA TGT ATG CGT TCT GTT GAC
AgR8      S  L  D  S  N  P  I  G  T  M  S  C  M  R  S  V  D
          TCA TTG GAT AGT AAC CCG ATC GGT ACC ATG TCA TGT ATG CGT TCT GTT GAC
AgSN3     S  L  D  S  N  P  I  G  T  M  S  C  M  R  S  V  D
          TCA TTG GAT AGT AAC CCG ATC GGT ACC ATG TCA TGT ATG CGT TCT GTT GAC
AgSN9     S  L  D  S  N  P  I  G  T  M  S  C  M  R  S  V  D
          TCA TTG GAT AGT AAC CCG ATC GGT ACC ATG TCA TGT ATG CGT TCT GTT GAC

```

SPGS > TCA CCC GGC TCA GTG ATG

AgR1	A	S	T	I	S	K	K	Q	W	N	S	Y ³⁶²	S	G	I	L ³⁶⁶	G
	GCA	AGT	ACT	ATA	TCT	AAA	AAG	CAA	TGG	AAC	AGC	TAT	TCC	GGT	ATT	TTG	GGT
AgR8	A	S	T	I	S	K	K	Q	W	N	S	Y	S	G	I	L	G
	GCA	AGT	ACT	ATA	TCT	AAA	AAG	CAA	TGG	AAC	AGC	TAT	TCC	GGT	ATT	TTG	GGT
AgSN3	A	S	T	I	S	K	K	Q	W	N	S	Y	S	G	I	L	G
	GCA	AGT	ACT	ATA	TCT	AAA	AAG	CAA	TGG	AAC	AGC	TAT	TCC	GGT	ATT	TTG	GGT
AgSN9	A	S	T	I	S	K	K	Q	W	N	S	Y	S	G	I	L	G
	GCA	AGT	ACT	ATA	TCT	AAA	AAG	CAA	TGG	AAC	AGC	TAT	TCC	GGT	ATT	TTG	GGT
AgR71															I	L	G
															ATT	TTG	GGT

Y362A VER < CGG AGC CCG TAG GAG TCG

L366F < AGC CCG TAG AAG TCG

F368I ou V < TAG GAG TCG

AgR1	F ^{368P}	S	A	P	T	V	D	G	I ³⁷⁷	L	L	P	E	H	P	L	
	TTT	CCA	TCT	GCG	CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgR8	F	P	S	A	P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
	TTT	CCA	TCT	GCG	CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgSN3	F	P	S	A	P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
	TTT	CCA	TCT	GCG	CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgSN9	F	P	S	A	P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
	TTT	CCA	TCT	GCG	CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgSN16					P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
					CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgSN18					P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
					CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgR3					P	T	V	D	G	T	L	L	P	E	H	P	L
					CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ACT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG
AgR71	F	P	S	A	P	T	V	D	G	I	L	L	P	E	H	P	L
	TTT	CCA	TCT	GCG	CCC	ACC	GTG	GAC	GGA	ATT	CTA	CTT	CCG	GAA	CAC	CCA	CTG

AAA GGG AGC < L366F

TAT GGG AGC CGC GGG < F368I

CAT GGG AGC CGC GGG < F368V

SAP < AGC CGC GGT TGT TAG CTG

AgR1	D	M	L	A	K	A	N ³⁹⁴	F	S	N	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	AAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgR8	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgSN3	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgSN9	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L			
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC			
AgSN16	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgSN18	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgR3	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC
AgR71	D	M	L	A	K	A	N	F	S	D	I	D	I	L	I	G	S
	GAC	ATG	TTG	GCA	AAG	GCA	AAC	TTT	TCG	GAT	ATC	GAT	ATA	CTC	ATT	GGA	AGC

AgR1 N L N E G⁴⁰⁶ T Y⁴⁰⁸ F⁴⁰⁹ L L Y⁴¹² D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGC ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgR8 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGA ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgSN3 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGC ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgSN16 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGA ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgSN18 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGA ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgR3 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGA ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC
 AgR71 N L N E G T Y F L L Y D F V D F F
 AAT CTG AAC GAA GGA ACA TAT TTT TTG CTG TAC GAT TTT GTT GAC TTC TTC

Y408I < CTC CCG TGA TAG AAG AAC GAC
 F409I < CCG TGA ATG TAG AAC GAC ATG
 Y412C < G AAC GAC ACA CTA AAC TAG C
 Y412I < AAG AAC GAC TAG CTA AAC TAG
 D413G < AAC GAC ATG CCT AAC TAG CTA
 K420G < G AAG

AgR1 D R⁴²⁰ T S A T A L P R E K F V Q I V
 GAC CGG ACG TCG GCC ACC GCT TTG CCA AGG GAA AAA TTT GTA CAA ATA GTC
 AgR8 D R T S A T A L P R E K F V Q I V
 GAC CGG ACG TCG GCC ACC GCT TTG CCA AGG GAA AAA TTT GTT CAA ATA GTC
 AgSN3 D R T S A T A L P R E K F V Q I V
 GAC CGG ACG TCG GCC ACC GCT TTG CCA AGG GAA AAA TTT GTA CAA ATA GTC
 AgR71 D R
 GAC CGG

CTA CCC CTG CTA CGG TG < K420G

SEQ 3 < GAC CTT TAA TAC

AgR1 N V I F K D R T Q L E R D A I I Y
 AAC GTA ATA TTC AAA GAT AGA ACG CAA CTG GAA AGA GAT GCC ATT ATA TAT
 AgR8 N
 AAC GT
 AgSN3 N V I F K D R T Q L E R D A I I Y
 AAC GTA ATA TTC AAA GAT AGA ACG CAA CTG GAA AGA GAT GCC ATT ATA TAT
 TTG TTA < SEQ 3
 SKA > AGC AAG GCG TCG GAA CCT
 PER < GGA CTC GCA CTT CGC TAA

AgR1 Q Y S G W E K K E V D D I Y S N Q
 CAG TAT TCG GGA TGG GAA AAA AAA GAA GTG GAT GAC ATT TAT TCC AAT CAA
 AgSN3 Q Y S G W E K K E V D D I Y S N Q
 CAG TAT TCG GGA TGG GAA AAA AAA GAA GTG GAT GAC ATT TAT TCC AAT CAA
 AgSN16 D D I Y S N Q
 GAT GAC ATT TAT TCC AAT CAA
 AgSN18 D D I Y S N Q
 GAT GAC ATT TAT TCC AAT CAA
 AgR3 D D I Y S N Q
 GAT GAC ATT TAT TCC AAT CAA

AgR1 K Q L S D V V A D Y F F V C P T N
 AAA CAA TTG AGC GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgR8 D V V A D Y F F V C P T N
 GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgSN3 K Q L S D V V A D Y F F V C P T N
 AAA CAA TTG AGC GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgSN16 K Q L S D V V A D Y F F V C P T N
 AAA CAA TTG AGC GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgSN18 K Q L S D V V A D Y F F V C P T N
 AAA CAA TTG AGC GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgR3 K Q L S D V V A D Y F F V C P T N
 AAA CAA TTG AGC GAC GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 AgR71 V V A D Y F F V C P T N
 GTG GTT GCA GAT TAT TTT TTT GTT TGT CCT ACC AAC
 OL 62 > TTC ACC TGC CCC ACC AAC
 B8 < (T,G,A) GCT CGT CAG CCG CTA GTA

AgR1 L F A N I V S⁴⁹⁰ S R G A R V Y Y Y F⁵⁰⁰
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCC AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 AgR8 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y F
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCC AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 AgSN3 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y L
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCA AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT CTC
 AgSN16 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y F
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCA AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 AgSN18 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y F
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCA AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 AgR3 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y F
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCC AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 AgR71 L F A N I V S S R G A R V Y Y Y F
 CTA TTT GCA AAC ATC GTG TCC AGT CGT GGA GCT CGA GTG TAC TAT TAT TTC
 GAG TAT GCC CAG > OL 62
 CTC AAA CGC GAC CCT GAA < LGL

AgR1 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgR8 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgSN3 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgR11 S H L W G D W M G V L
 TCA CAC TTG TGG GGT GAT TGG ATG GGC GTG TTG
 AgSN16 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgSN18 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgR3 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 AgR71 F T H R T D S H L W G
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC TCA CAC TTG TGG GGC
 TTC ACT CAC AGG ACC GAC > FTH

B5 < ACC CCG CTC ACC TAC CCG CAC CAG
 H518K < CCG CAC GAA

AgR11 H⁵¹⁸ G D E M Q Y V F G H P L N⁵³¹ M S M
 CAT GGT GAC GAG ATG CAA TAC GTG TTT GGC CAT CCG TTG AAC ATG TCG ATG
 TTC CCG CTA CTC TAG CTT < H518K
 GTA CC < B5

```

AgR11      P   Y   N   A   R   E   R   D   L   S   I   R   I   M   E   A   F
          CCA TAC AAC GCC AGG GAA AGA GAC TTA AGC ATA CGA ATC ATG GAG GCG TTT

AgR11      T   R   F   S   L   T   G   T   P   V   S   D   D   I   D   W   P
          ACC AGA TTT TCG TTG ACC GGA ACA CCA GTA TCA GAT GAC ATA GAT TGG CCA

          B6 < AAA CGG TTC TGT CCG TTG GGA CGG GT          N569S < CTC ACC GGT

AgR11      L569 Y   N   E   S   K   P   I   Y   H   V   W   N   A   A   E   M
          CTA TAC AAT GAA TCA AAG CCC ATT TAT CAT GTA TGG AAT GCT GCA GAA ATG

          TGG AAG AGG TTC < N569S

AgR11      H   V   G   Y   G   P   R   A   A   E   C   Q   F   R   N   G   F
          CAC GTT GGT TAC GGA CCT AGA GCA GCT GAA TGT CAG TTT CGG AAT GGA TTT

AgR11      F   P   K   I   A   Q   A   L   K   E   T   S   K   T   T   C615 E
          TTT CCG AAA ATC GCC CAA GCC TTG AAA GAA ACT AGT AAA ACT ACT TGT GAA

          C615R < CGT CCA TGA GCG CTA CCGATC

AgR11      D   Y   P   D   S   M   P   T   I   N   E   N   C   T   F   T   S
          GAT TAT CCA GAC TCC ATG CCC ACT ATC AAT GAA AAT TGT ACG TTC ACG TCA
AgR12                                     F   T   S
AgR15                                     TTC ACG TCA
                                           F   T   S
                                           TTC ACG TCA

AgR11      S   F   A   T   V   N   P   Q   I   S   F   T   I   I   F   I   F
          TCG TTT GCT ACT GTC AAT CCT CAA ATC TCC TTC ACC ATA ATA TTT ATC TTC
AgR12      S   F   A   T   V   N   P   Q   I   S   F   T   I   I   F   I   F
          TCG TTT GCT ACT GTC AAT CCT CAA ATC TCC TTC ACC ATA ATA TTT ATC TTT
AgR15      S   F   A   T   V   N   P   Q   I   S   F   T   I   I   F   I   F
          TCG TTT GCT ACT GTC AAT CCT CAA ATC TCC TTC ACC ATA ATA TTT ATC TTT

AgR11      V   L   P   A   Y   G   L   F
          GTT CTA CCG GCA TAT GGA TTG TTC
AgR12      V   L   P   A   Y   G   L   F   .   R   K   T   T   T   .   I   Y
          GTT CTA CCG GCA TAT GGA TTG TTC TAA AGA AAA ACA ACA ACT TAA ATA TAT
AgR15      V   L   P   A   Y   G   L   F   .   G   K   T   T   T   .   I   Y
          GTT CTA CCG GCA TAT GGA TTG TTC TAA GGA AAA ACA ACA ACT TAA ATA TAT

AgR12      Q   S   K   Q   K   I   N   K   .   K   .   N   E   K   K   K   K
          CAA AGC AAA CAA AAA ATA AAT AAA TAA AAA TAA AAC GAG AAA AAA AAA AAA
AgR15      Q   S   K   Q   K   -----
          CAA AGC AAA CAA AAA

AgR12      K   K   K   K   N           DTSPEC
          AAA AAA AAA AAA AAT T
AgR15      ----K   K   K   N           DTSPEC
          AAA AAA AAA AAT T

```

ANNEXE 3: ALIGNEMENTS SEQUENCES *Ace2 CULEX PIPIENS* (EXONS) avec position des amorces

>: amorce sens; <: amorce reverse

(les nombres en exposant font référence à la position chez la drosophile)

```

PIP.MC          Y   E   Y   F   P   G   F   A   G   E   E   M   W121   N   P
                TAT GAA TAT TTC CCG GGT TTT GCC GGC GAG GAA ATG TGG AAT CCC

OL21F > G CGT TAC GAG TAC TTC          F1 NEW > GGC GAR GAR ATG TGG AAY CC
                                           B9 > TGG AAT CCC

GTT CTC GCA CCG CTC ATG AAG < Y109G
      GCA ATG CTC CCG AAG GGG CCG < Y111G
                        AAG GGG CCC TCG AGG CCG CTC CTC < F115S
                                W121A < CTC CTC TAG CGC TTG GGG TTG
                                           B2 > TGG AAC CCA

TC3              D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
                GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TC5              D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
                GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TC11             D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
                GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TEMR14   N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TC102/1        D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
                GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
PIP.MC   N   T125 N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
HAWAI L       N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC GTA TCG GAA GAX TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCG ACG
HAWAI A       N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TEMR14CYR1    D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
                GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
MRES9.6   N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
ESPRO2.4   N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
ESPRO3.4   N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
GARA7.6    N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
GARA8.1    N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
PADO18.6   N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
PR10.22    N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
PR11.3     N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
PR12.4     N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG
TC6.6      N   T   N   V   S   E   D   C   L   Y   L   N   I   W   V   P   T
AAC ACA AAC GTA TCG GAG GAC TGT CTG TAT CTG AAC ATT TGG GTA CCA ACG

AAC ACG AAC GTC TCG GAG > NTN
AAC ACG AAC GTK (fin B9)
                        GAG AGG CTC CTG ACG AAT < LSE
                                CTC CTG ACG GAG ATG TAT < SEQ1
AAC ACC AAT GTC TCT GAG GAC TGC CTG TA > fin B2

```


CCC GCC GCA CGG TTG CCC CCA < SEQ2

TC3	F ¹⁵⁸ Q D D E ¹⁶² D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
TC5	F Q D D E D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
TC11	F Q D D E D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
TEMR14	F Q D D E D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
TC10	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
PIP.MC	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
HAWAI L	F Q D D D D F Q R Q H Q S N	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC AAC	AAG GGT GGC CTC
HAWAI A	F Q D D D D F Q R Q H Q S N	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC AAC	AAG GGC GGC CTC
TEMRCYR1	F Q D D E D F Q R Q H	
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC	
MRES9.6	F Q D D E D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
ESPRO2.4	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
ESPRO3.4	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
GARA7.6	S Q D D E D F Q R Q H Q S	K G G L
	TCC CAG GAC GAT GAG GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
GARA8.1	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
PADO17.2	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
PADO18.6	F Q D D D D F Q	
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG	
PR10.22	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
PR11.3	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC
PR12.4	F Q D D D D F Q R Q	
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG	
TC6.6	F Q D D D D F Q R Q H Q S	K G G L
	TTC CAG GAC GAT GAT GAC TTC CAG CGG CAG CAC CAG TCC	AAG GGC GGC CTC

QSK < GTC AGG TTC CCG CCG GAG
 OL23 > AAT CCG CAG TCG ACG ACC AAC

TC3	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
TC5	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
TC11	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
TEMR14	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
TC10	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
PIP. MC	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
HAWAI L	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGA	GGG	TTT	ATG	AGT	GGA	ACA	TCA	ACG
HAWAI A	A	M	L	V	W	I	Y	G	G	G	F	M	S	G	T	S	T
	GCG	ATG	CTG	GTC	TGG	ATC	TAC	GGG	GGT	GGG	TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG
MRES9.6	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
ESPRO2.4	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
ESPRO3.4	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
GARA7.6	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
GARA8.1	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
PADO17.2	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
PR10.22	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
PR11.3	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
TC6.6	A	M	L	V													
	GCG	ATG	CTG	GTC	T												
PR1-10											F	M	S	G	T	S	T
											TTT	ATG	AGC	GGA	ACA	TCA	ACG

CC TAG ATR CCI CCA CCI AAR TAC T < G1 NEW
 CCG CCA CCG AAG ATG TGG CCT AGC < M191Y
 TAC AGG CCA TGA AGC TGT <MSGT

TC3	L ¹⁹⁷	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V ²⁰⁸	G	N	V	I	V
	CTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
TC5	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	CTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
TC11	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	CTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
TEMR14	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	CTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
TC10	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	I	G	N	V	I	V
	TTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	ATT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
PIP. MC	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	TTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGG	AAC	GTA	ATC	GTG
HAWAI L	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	CTG	GAT	GTT	TAC	AAC	GCA	GAG	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
HAWAI A	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	TTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG
PR1-10	L	D	V	Y	N	A	E	I	L	A	A	V	G	N	V	I	V
	TTG	GAC	GTT	TAC	AAC	GCA	GAA	ATA	CTG	GCG	GCC	GTT	GGA	AAC	GTA	ATC	GTG

CC CTG GAC ACC TAC AAT G > OL 66
 CC CTG GAC GGC TAC AAT GCG > OL 67
 CC CTG GAC GAG TAC AAT GCG GAT ATC > OL 68
 CC CTG GAC AAG TAC AAT GCG > OL 69
 CC CTG GAC GTC TAC AAT > OL 41A
 GG GAC CTG CAG ATG TTA CGC < I199V
 CCG CTA AAT AAC CGC CGA < GDL

TC3	A	S	M	Q	Y	R	V ²²⁰	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTA	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
TC5	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTG	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
TC11	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTA	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
TEMR14	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTA	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
TC10	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTG	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
PIP. MC	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G	F	F	Y	L	S	P
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTG	GGA	GCA	TTC	GGT	TTC	TTC	TAC	CTT	TCG	CCC
HAWAI L	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G						
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTG	GGA	GCA	TTC	GGT						
HAWAI L	A	S	M	Q	Y	R	V	G	A	F	G						
	GCC	TCG	ATG	CAG	TAC	CGA	GTG	GGA	GCA	TTC	GGT						

GTC ATA GCG GAT CCT CGG AAA < V220L
 B3 > TAC CGG GTG GGC GCC TTT GGC TTC C
 ATG GCC CAC CCG CGG AAA CCG AAG G < B4

TC3	Y	L	N	G	R	E	E ²³⁸	E	A	P	G ²⁴²	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GAG	GAG	GCT	CCA	GGT	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG
TC5	Y	L	N	G	R	E	G	E	A	P	G	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GGG	GAG	GCT	CCA	GGT	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG
TC11	Y	L	N	G	R	E	E	E	A	P	G	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GAA	GAG	GCT	CCA	GGT	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG
TEMR14	Y	L	N	G	R	E	G	E	A	P	G	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GGG	GAG	GCT	CCA	GGT	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG
TC10	Y	L	N	G	R	E	E	E	A	P	G	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GAG	GAG	GCT	CCA	GGC	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG
PIP. MC	Y	L	N	G	R	E	E	E	A	P	G	N	V	G	L	W
	TAC	TTG	AAC	GGC	CGT	GAA	GAG	GAG	GCT	CCA	GGC	AAC	GTC	GGA	CTT	TGG

EDSD > GAG GAT AGC GAT GAC GCG

CCG TTA TGC CCG GAT ACCCTA <V244T

TC3	D	Q	A	L	A	I ²⁵³	R	W	L	K	E	N	A	K	A ²⁶²	F	G
	GAC	CAA	GCG	CTG	GCT	ATT	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	GCC	TTC	GGC
TC5	D	Q	A	L	A	I	R	W	L	K	E	N	A	K	A	F	G
	GAC	CAA	GCG	CTG	GCT	ATT	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	GCC	TTC	GGC
TC11	D	Q	A	L	A	T	R	W	L	K	E	N	A	K	P	F	G
	GAC	CAA	GCG	CTG	GCT	ACT	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	CCG	TTC	GGC
TEMR14	D	Q	A	L	A	I	R	W	L	K	E	N	A	K	P	F	G
	GAC	CAA	GCG	CTG	GCT	ATT	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	CCG	TTC	GGC
TC10	D	Q	A	L	A	I	R	W	L	K	E	N	A	K	A	F	G
	GAC	CAA	GCG	TTG	GCT	ATC	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	GCC	TTC	GGC
PIP. MC	D	Q	A	L	A	I	R	W	L	K	E	N	A	K	A	F	G
	GAC	CAA	GCG	TTG	GCT	ATC	CGG	TGG	CTC	AAG	GAG	AAC	GCC	AAG	GCC	TTC	GGC

TC3 G G²⁶⁶ P D L I T L F²⁷³ G E S²⁷⁶ A G²⁷⁸ R²⁷⁹ S S
 GGC GGT CCG GAT TTG ATC ACA CTG TTT GGC GAA TCG GCC GGA CGG AGT TCG
 TC5 G D P D L I T L F G E S A G
 GGC GAT CCG GAT TTG ATC ACA CTG TTT GGC GAA TCG GCC GGA
 TC11 G D P D L I T L L G E S A G G S S
 GGC GAT CCG GAT TTG ATC ACA CTG CTT GGC GAA TCG GCC GGG GGC AGT TCG
 TEMR14 G D P D L I T L F G E S A G G S S
 GGC GAT CCG GAT TTG ATC ACA CTG TTT GGC GAA TCG GCC GGG GGC AGT TCG
 TC10 G D P D L I T L F G E S A G G S S
 GGC GAT CCG GAT TTG ATC TCG GCC GGG GGC AGT TCG
 PIP. MC G D P D L I T L F G E S A G G S S
 GGC GAT CCG GAT TTG ATC ACG CTG TTT GGC GAA TCG GCG GGG GGC AGT TCG

F1 SENS > TTY GGI GAY TCI GCI GG
 F2 SENS > TTY GGI GAR AGY GCI GG
 OL 85 > ACA CTG TTC GGA CAG TCG GCT GGG TCC AG
 AAR CCI CTY AGI CGI CC < F1 REV
 AAR CCI CTY TCR CGI CC < F2 REV
 GI GAI AAG CCI CTC AGC CG < TLF REV
 AAG CCT CTC CGC CGA CCA AGG TCA < S276A

TC3 V S L H²⁸⁵ L L S P A T R G L S H R G
 GTC AGC TTG CAC CTG TTG TCC CCG GCA ACG CGT GGG CTG TCC CAC CGT GGC
 TC11 V S L H L L S P A T R G L S H R G
 GTC AGC TTG CAC CTG TTG TCC CCG GCA ACG CGT GGG CTG TCC CAC CGT GGC
 TC4 G L S H R G
 GGG CTG TCC CAC CGT GGC
 TEMR14 V S L H L L S P A T R G L S H R G
 GTC AGC TTG CAC CTG TTG TCC CCG GCA ACG CGT GGG CTG TCC CAC CGT GGC
 TC10 V S L H L L S P A T R G L S H R G
 GTC AGC TTG CAT CTG TTG TCC CCG GCA ACG CGT GGG CTG TCC CAC CGT GGC
 PIP. MC V S L H L L S P A T R G L S H R G
 GTC AGC TTG CAT CTG TTG TCC CCG GCA ACG CGT GGG CTG TCC CAC CGT GGC

MVK < TAC CAT TTT GCA CCA TAG

TC3 I L³⁰⁰ Q³⁰¹ P³⁰² G T L N A³⁰⁷ P W S³¹⁰ H M T A E
 ATC CTG CAA CCT GGA ACC CTG AAC GCA CCC TGG AGC CAC ATG ACG GCG GAG
 TC11 I L Q P G T L N A P W S H M T A E
 ATC CTG CAA CCT GGA ACC CTG AAC GCA CCC TGG AGC CAC ATG ACG GCG GAG
 TC4 I L Q S G T L N A P W S H M T A E
 ATC TTG CAG TCC GGA ACC CTG AAC GCG CCC TGG AGT CAC ATG ACG GCG GAG
 TEMR14 I L Q P G T L N A P W S H M T A E
 ATC CTG CAA CCT GGA ACC CTG AAC GCA CCC TGG AGC CAC ATG ACG GCG GAG
 TC10 I L Q S G T L N A P W S H M T A E
 ATC TTG CAG TCC GGA ACC CTG AAC GCG CCC TGG AGC CAC ATG ACG GCG GAG
 PIP. MC I L Q S G T L N A P W S H M T A E
 ATC TTG CAA TCC GGA ACC CTG AAC GCG CCC TGG AGC CAC ATG ACG GCG GAG

S310G VER > ACT ATG AAC GCC CCC TGG GGG
 SYM > AGC TAC ATG ACT GGC GAA
 TAC GTC AGC CGT TGA TAC TTG < G303A
 T313G < GTG TAC CCG AGG CTCTTCCGG

TC3 K A L³¹⁸ S V A E S L³²⁴ I D D C N C N V
 AAG GCC CTG TCG GTG GCG GAA TCG CTA ATC GAC GAT TGC AAC TGC AAC GTC
 TC11 K A L S V A E S L I D D C N C N V
 AAG GCC CTG TCG GTG GCG GAA TCG CTA ATC GAC GAT TGC AAC TGC AAC GTC
 TC4 K A L S V A E S L I D D C N C N V
 AAG GCC CTA TCG GTG GCG GAA TCG CTC ATC GAC GAT TGC AAC TGC AAC GTC
 TEMR14 K A L S V A E S L I D D C N C N V
 AAG GCC CTG TCG GTG GCG GAA TCG CTA ATC GAC GAT TGC AAC TGC AAC GTC
 TC10 K A L S V A E S L
 AAG GCC CTA TCG GTG GCG GAA TCG CTC
 PIP. MC K A L S V A E S L I D D C N C N V
 AAG GCC CTA TCG GTG GCG GAA TCG CTC ATC GAC GAT TGC AAC TGC AAC GTC

C328W VER > GGC AAG GCG CTG ATC AAC GAC TGG

TC11 T L L K D S P G S V M H³⁴⁴ C M R N V
 ACC CTG CTG AAG GAC TCA CCC GGC TCA GTG ATG CAT TGC ATG CGA AAC GTG
 TC4 T L L K D S P G S V M H C M R N V
 ACC CTG CTG AAG GAC TCA CCC GGC TCA GTG ATG CAC TGC ATG CGA AAC GTG
 TEMR14 T L L K D S P G S V M H C M R N V
 ACC CTG CTG AAG GAC TCA CCC GGC TCA GTG ATG CAT TGC ATG CGA AAC GTG
 PIP. MC T L L K D S P G S V M H C M R N V
 ACC CTG CTG AAG GAC TCA CCC GGC TCA GTG ATG CAC TGC ATG CGA AAC GTG

TC11 D A K T I S V Q Q W N S Y S G I L
 GAC GCA AAA ACC ATC TCG GTC CAG CAG TGG AAC TCG TAC TCA GGC ATT TTG
 TC4 D A K T I S
 GAC GCA AAA ACC ATC TCG
 TEMR14 D A K T I S V Q Q W N S Y S G I L
 GAC GCA AAA ACC ATC TCG GTC CAG CAG TGG AAC TCG TAC TCA GGC ATT TTG
 PIP. MC D A K T I S V Q Q W N S Y S G I L
 GAC GCA AAA ACC ATC TCG GTC CAG CAG TGG AAC TCG TAC TCG GGC ATT TTG

Y362A VER < CGG AGC CCG TAG GAG TCG

L366F < AGC CCG TAG AAG TCG

F368I ou V < TAG GAG

TC11 G F P S A P T I D G³⁷⁶ V F³⁷⁸ M T A D P
 GGA TTC CCG TCG GCG CCA ACA ATC GAC GGT GTG TTT ATG ACG GCC GAC CCG
 TC4 G F P S A P T I D G V F M T A D P
 GGA TTC CCG TCG GCG CCA ACA ATC GAC GGT GTG TTT ATG ACG GCC GAC CCG
 TEMR14 G F P S A P T I D G V F M T A D P
 GGA TTC CCG TCG GCG CCA ACA ATC GAC GGT GTG TTT ATG ACG GCC GAC CCG
 PIP. MC G F P S A P T I D G V F M T A D P
 GGA TTC CCG TCG GCG CCA ACA ATC GAC GGT GTG TTT ATG ACG GCC GAC CCG

GGG AGC (fin L366F)

TCG TAT GGG AGC CGC GGG (fin F368I)

TCG CAT GGG AGC CGC GGG (fin F368V)

TC11 M T M L³⁸⁷ R E A N L E G V³⁹⁵ D I³⁹⁷ L V G
 ATG ACC ATG TTG CGC GAG GCC AAT TTG GAG GGA GTC GAC ATC TTG GTG GGA
 TC4 M T M L R E A N L E G I D I L V G
 ATG ACC ATG CTG CGC GAG GCC AAT TTG GAG GGA ATC GAC ATT TTG GTG GGA
 TEMR14 M T M L R E A N L E G V D I L V G
 ATG ACC ATG TTG CGC GAG GCC AAT TTG GAG GGA GTC GAC ATT TTG GTG GGA
 PIP. MC M T M L R E A N L E G I D I L V G
 ATG ACC ATG CTG CGC GAG GCC AAT TTG GAG GGA ATC GAC ATT CTG GTG GGA
 TC11 S N R D E G T Y F L L Y D F I D Y
 AGT AAC CGT GAC GAA GGC ACA TAC TTC CTG TTG TAC GAT TTC ATC GAT TAT

TC4 S N R D E G T Y F L L Y D F I D Y
 AGT AAC CGT GAC GAA GGC ACA TAC TTC CTG TTG TAC GAT TTC ATC GAT TAT
 TEMR14 S N R D E G T Y F L L Y D F I D Y
 AGT AAC CGT GAC GAA GGC ACA TAC TTC CTG TTG TAC GAT TTC ATC GAT TAT
 PIP. MC S N R D E
 AGT AAC CGT GAC GAA

Y408I < CTC CCG TGA TAG AAG AAC GAC
 F409I < CCG TGA ATG TAG AAC GAC ATG
 Y412C < G AAC GAC ACA CTA AAC TAG C
 Y412I < AAG AAC GAC TAG CTA AAC TAG

TC11 F E K D A A T S L P R D K F L E I
 TTC GAG AAG GAT GCA GCC ACG TCG TTG CCG AGG GAT AAG TTC TTG GAA ATA
 TC4 F E K D A A T S L P R D K F L E I
 TTC GAG AAG GAT GCA GCC ACG TCG TTG CCG AGG GAT AAG TTC TTG GAA ATA
 TEMR14 F E K D A A T S L P R D K F L E I
 TTC GAG AAG GAT GCA GCC ACG TCG TTG CCG AGG GAT AAG TTC TTG GAA ATA

K420G < GAAG CTA CCC CTG CTA CGG TG
 SEQ 3 < GAC CTT TAA TAC
 EKF < CTT TTT AAA CAT GTT TAT

TC11 M N T I F S K A S E P E R E A I
 ATG AAC ACC ATT TTC AGC AAG GCG TCG GAA CCT GAG CGT GAA GCG ATT
 TC4 M N T I F S K A S E
 ATG AAC ACC ATT TTC AGC AAG GCG TCG GAA
 TEMR14 M N T I F S K A S E P E R E A I I
 ATG AAC ACC ATT TTC AGC AAG GCG TCG GAA CCT GAG CGT GAA GCG ATT ATA
 TTG TTA (fin SEQ 3)

TEMR14 F Q Y T G W E S G N D G Y Q N Q Q
 TTC CAG TAC ACT GGC TGG GAG AGT GGC AAC GAT GGA TAC CAA AAT CAG CAA

TEMR14 Q V G R A V G D H F F I C P T N E
 CCA GTC GGG CGA GCA GTC GGC GAT CAT TTT TTC ATC TGT CCC ACC AAC GAG
 OL 62 > TTC ACC TGC CCC ACC AAC GAG
 B8 < D GCT CGT CAG CCG CTA GTA

TEMR14 F A L G L T E Q G A S V H Y Y Y F
 TTT GCG CTG GGA CTT ACA GAG CAG GGT GCT TCG GTT CAT TAT TAC TAC TTT
 TAT GCC CAG (fin OL 62)

TEMR14 T H R T S T S K W G E W M G V L H
 ACG CAT CGC ACG AGC ACC TCT AAG TGG GGC GAG TGG ATG GGC GTG CTG CAT GG
 ACC CCG CTC ACC TAC CCG CAC CAG GTA CC<B5

ANNEXE 4: ALIGNEMENTS SEQUENCES INTRON 3 *Ace2 CULEX PIPPIENS*

*
Q TEMR CYR1 GAT GTAAGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGAAC
Q MRES9.6 GAT GTAAGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGAAC
P ESPRO2.4 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P ESPRO3.4 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P GARA7.6 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P GARA8.1 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAATAC
P PADO7.2 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P PADO18.6 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P PR10.22 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P PR11.3 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P PR12.4 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P TC6.6 GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P PIP.MC GAC GTATGTACTTCTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
P HAWAI L/P GAC GTAAGTACTCTGTC:CTTGCCGAGCTGCCATAAGGACACTATAC
P HAWAI AD GAT GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
Q HAWAI HM9 GAT GTAAGTACTACTTCTGCTTG:.....TTAGTACACAGAAC
Q HAWAI MNM1 GAT GTAAGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGAAC
P MSE DB (") GAC GTATGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGTAC
Q S-LAB DB (") GAT GTAAGTACTACTTCTTCTTG:.....TTAGTACACAGAAC

*: Q = s.e. *quinquefasciatus*; P = s.e. *pipiens*
("): séquences Denis Bourquet (1996)

TEMR CYR1 GCCAGAAAAATATCGATGATG:CTCTGTTAGGATTTTTTTGGCAATCGC
MRES9.6 GCCAGAAAAATATCGATGATG:CTCTGTTAGGATTTTTTTGGCAATCGC
ESPRO2.4 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
ESPRO3.4 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
GARA7.6 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
GARA8.1 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PADO17.2 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PADO18.6 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PRAIAS10.22 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PR11.3 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PR12.4 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
TC6.6 GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
PIP.MC GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
HAWAI L/P GACAGTAAACATCGATGTTTTGAACATAGTC:A:ACTTAACGGCNTAC
HAWAI AD GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
HAWAI HM9 GCCAGAAAAATATCGATGATG:CTCTGTTAGGATTTTTTTGACAATCGC
HAWAI MNM1 GCCAGAAAAATATCGATGATG:CTCTGTTAGGATTTTTTTGGCAATCGC
MSE DB GACAGAAAAATGTCGATGATGG:CTCTGTCAGAAGTTTTTTGACAATCAC
S-LAB DB GCCAGAAAAATATCGATGATG:CTCTGTTAGGATTTTTTTGACAATCGC

TEMR CYR1 TTATTGG:TTCTTCGATGATTCTGAAGGAATTTATAGTAAATGGTTGAGA
MRES9.6 TTATTGG:TTCTTCGATGATTCTGAAGGAATTTATAGTAAATGGTTGAGA
ESPRO2.4 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
ESPRO3.4 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
GARA7.6 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
GARA8.1 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PADO17.2 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PADO18.6 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PR10.22 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PR11.3 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PR12.4 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
TC6.6 TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
PIP.MC TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
HAWAI L/P AT:CCTAAAATTTATATCGGTGGACGACGGCCNTTTTGCTTGCAAAACAT
HAWAI AD TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
HAWAI HM9 TTATTGG:TTCTTCGATGATTCTGAAGGAATTTATAGTAAATGGTTGAGA
HAWAI MNM1 TTATTGG:TTCTTCGATGATTCTGAAGGAATTTATAGTAAATGGTTGAGA
MSE DB TTTTGA:TTCTTCGATCATTCTCGAAGAATTTATAGTGATATGGTGGAAA
S-LAB DB TTATTGG:TTCTTCGATGATTCTGAAGGAATTTATAGTAAATGGTTGAGA

TEMR CYR1	CGCATGATACTAAATATGAGAACTAACTGAACTTTTAAAATTTTCTGTGTC
MRES9.6	CGCATGATACTAAATATGAGAACTAACTGAACTTTTAAAATTTTCTGTGTC
ESPRO2.4	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
ESPRO3.4	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
GARA7.6	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
GARA8.1	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PADO17.2	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PADO18.6	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PR10.22	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PR11.3	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PR12.4	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
TC6.6	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
PIP.MC	CGCATGATAC:AGATATGAGAACTAACTAA:CTTGACATTTCTGTGCGAGC
HAWAI L/P	TGATATTTAACGTGCTTGTGATGATTT:::CTTGACATTTCTGTGCGAGC
HAWAI AD	CGCATGATACCAGATATGAGAACTAACTAACTTTTGACATTTTCTGTGTC
HAWAI HM9	CGCATGATACTAAATATGAGAACTAACTGAACTTTTAAAATTTTCTGTGTC
HAWAI MNM1	CGCATGATACTAAATATGAGAACTAACTGAACTTTTAAAATTTTCTGTGTC
MSE DB	CGCATGATACC
S-LAB DB	CGCATGATACT

TEMR CYR1	GAGCTGTGC:TTGTGGTGATTTAGTTGTGCGCGGCTCTGAGAGAGACAGG
MRES9.6	GAGCTGTGC:TTGTGGTGATTTAGTTGTGCGCGGCTCTGAGAGAGACAGG
ESPRO2.4	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
ESPRO3.4	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
GARA7.6	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
GARA8.1	GAGCTGTGCTTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGGT
PADO17.2	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
PADO18.6	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
PR10.22	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
PR11.3	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
PR12.4	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
TC6.6	GAGCTGTGC:TTGTGATGATTTAGTTGTTTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
PIP.MC	TGTGCTGTGATGATTTAGTTG:::TTCGTGGCTCTGAGAGAGACAGG
HAWAI L/P	:::AGTTGCCCCTGGA:::TCTGAAAGGAAGCCAAGACCGATC
HAWAI AD	GAGCTGTGAGTTGTTTCGTGGC:::TCTGAGAG:::AGACAGGTC
HAWAI HM9	GAGCTGTGC:TTGTGGTGATTTAGTTGTGCGCGGCTCTGAGAGAGACAGG
HAWAI MNM1	GAGCTGTGC:TTGTGGTGATTTAGTTGTGCGCGGCTCTGAGAGAGACAGG

TEMR CYR1	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTAGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAAAG
MRES9.6	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTAGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAAAG
ESPRO2.4	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
ESPRO3.4	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
GARA7.6	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
GARA8.1	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PADO17.2	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PADO18.6	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PR10.22	TCCAGATGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PR11.3	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PR12.4	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
TC6.6	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
PIP.MC	TCCAGAGTGTATTTTT:AGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
HAWAI L/P	:CTGAG:TGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCAATTATGCACCCACAACG
HAWAI AD	:CAGAG:TGTATTTTTTAGTAGTTGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAACG
HAWAI HM9	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTAGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAAAG
HAWAI MNM1	TCCAGAGTGTATTTTTTAGTAGTAGCGTAGGCGTTTATGCACCCACAAAG

TEMR CYR1	TGAATGGCTGTGGCA:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
MRES9.6	TGAATGGCTGTGGCA:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
ESPRO2.4	TGGCATGGCCGTGGC:CACCTCTTTATTG::CAG	TAC
ESPRO3.4	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
GARA7.6	TGAATGGCTGTGGCA:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
GARA8.1	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PADO17.2	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PADO18.6	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PR10.22	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PR11.3	GGCATGGCCGTGGCCACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PR12.4	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
TC6.6	GGCATGGCCGTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
PIP.MC	GGCATGCC:GTGGCC:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
HAWAI L/P	::::::::::CTGGCC:ACCTCTTT:ATTGCACAG	TACT
HAWAI AD	:::::::::::G::CAG	TAC
HAWAI HM9	TGAATGGCTGTGGCA:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC
HAWAI MNM1	TGAATGGCTGTGGCA:ACCTCTTT:ATTG::CAG	TAC

Annexe 5: Pourcentage d'homologie entre acétylcholinestérases d'invertébrés (d'après programme Alignp d'Infobiogen)

	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Anophel. stephensi</i>	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>Musca domesti.</i>	<i>Drosoph. melanog.</i>	<i>Leptinot. decemlin.</i>	<i>Boophil. decolor.</i>	<i>Boophil. microplus 1</i>	<i>Rhipicep. appendi.</i>	<i>Caenorh. briggsae 1</i>	<i>Caenorh. elegans 1</i>	<i>Caenorh. elegans 2</i>	<i>Caenorh. elegans x</i>	<i>Meloido. incognita 1</i>	<i>Meloido. javanica 1</i>
<i>Aedes aegypti</i>		83.7	55.3	58.9	62.2	57.5	33.2	32.9	31.3	33.6	34.2	31.1	31.9	34.5	34.5
<i>Anopheles stephensi</i>	83.7		55.1	58.9	62.5	55.1	32.0	32.3	29.6	33.2	34.0	29.9	30.8	34.8	34.8
<i>Lucilia cuprina</i>	55.3	55.1		80.5	72.6	48.0	28.4	28.8	26.8	28.4	29.0	26.0	26.1	29.5	29.4
<i>Musca domestica</i>	58.9	58.9	80.5		77.2	50.8	29.1	28.8	27.3	28.8	29.5	28.4	28.1	30.7	30.4
<i>Drosophila melanoga.</i>	62.2	62.5	72.6	77.2		53.1	30.4	30.1	28.9	31.2	32.1	28.4	28.6	32.2	31.7
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	57.5	55.1	48.0	50.8	53.1		34.2	34.5	32.9	34.4	34.5	31.5	33.7	33.3	33.5
<i>Boophilus decoloratus</i>	33.2	32.0	28.4	29.1	30.4	34.2		94.0	83.7	37.7	37.4	30.9	31.6	33.3	33.0
<i>Boophilus microplus 1</i>	32.9	32.3	28.8	28.8	30.1	34.5	94.0		82.2	37.0	37.5	31.0	32.3	34.0	33.7
<i>Rhipicephalus appendicula.</i>	31.3	29.6	26.8	27.3	28.9	32.9	83.7	82.2		33.3	33.4	29.6	30.3	31.7	31.6
<i>Caenorhabdi. briggsae 1</i>	33.6	33.2	28.4	28.8	31.2	34.4	37.7	37.0	33.3		94.7	30.9	33.0	61.2	61.1
<i>Caenorhabdi. elegans 1</i>	34.2	34.0	29.0	29.5	32.1	34.5	37.4	37.5	33.4	94.7		31.3	33.7	60.9	60.9
<i>Caenorhabdi. elegans 2</i>	31.1	29.9	26.0	28.4	28.4	31.5	30.9	31.0	29.6	30.9	31.3		35.7	33.1	32.8
<i>Caenorhabdi. elegans x</i>	31.9	30.8	26.1	28.1	28.6	33.7	31.6	32.3	30.3	33.0	33.7	35.7		31.7	31.3
<i>Meloidogyne incognita 1</i>	34.5	34.8	29.5	30.7	32.2	33.3	33.3	34.0	31.7	61.2	60.9	33.1	31.7		98.8
<i>Meloidogyne javanica 1</i>	34.5	34.8	29.4	30.4	31.7	33.5	33.0	33.7	31.6	61.1	60.9	32.8	31.3	98.8	

